

## Tesis de Posgrado

# Desarrollo y aplicaciones de biosensores enzimáticos y microbianos

Cortón, Eduardo

2000

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Cortón, Eduardo. (2000). Desarrollo y aplicaciones de biosensores enzimáticos y microbianos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3221\\_Corton.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3221_Corton.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Cortón, Eduardo. "Desarrollo y aplicaciones de biosensores enzimáticos y microbianos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2000.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3221\\_Corton.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3221_Corton.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tesis Doctoral para optar al Título de Doctor de la  
Universidad de Buenos Aires

"Desarrollo y Aplicaciones de  
Biosensores Enzimáticos y Microbianos"

por Eduardo Cortón

Director de Tesis: Dr. Fernando Battaglini  
Co-Director: Dra. Sandra M. Ruzal

INQUIMAE, Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química-  
Física y Laboratorio de Microbiología, Departamento de Química  
Biológica.

2000



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Thesis in fulfillment of the Degree of a Doctor of  
the University of Buenos Aires

# "Development and Applications of Enzymatic and Microbial Biosensors"

by Eduardo Cortón

Director of Thesis: Dr. Fernando Battaglini  
Co-Director: Dra. Sandra M. Ruzal

INQUIMAE, Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química-  
Física y Laboratorio de Microbiología, Departamento de Química  
Biológica.

2000

# RESUMEN

Se construyeron biosensores enzimáticos cableados basados en la inmovilización de una oxidasa (glucosa oxidasa, lactato oxidasa ó peroxidasa) en un hidrogel redox formado por el entrecruzamiento de la enzima, polialilamina conteniendo un complejo de osmio (PAAOs) y polietilenglicidiléter (PEG) como entrecruzante, sobre electrodos de carbón vítreo y de oro. Se estudió el rango de linealidad y la reproducibilidad de estos electrodos al ser utilizados como detectores en un sistema FIA. Utilizando electrodos basados en glucosa oxidasa se estudió el efecto de distintas proporciones de entrecruzante (PEG); utilizando técnicas de voltametrías cíclicas se estudió el efecto del cambio de fuerza iónica en el medio. La leche afecta de manera irreversible a estos electrodos monoenzimáticos.

Se diseñaron distintos tipos de biosensores bienzimáticos bicapa, en los que peroxidasa entrecruzada con PAAOs se encuentra en la capa mas cercana al electrodo, y lactato oxidasa en la capa más externa. Se estudió el efecto de la leche sobre ambas capas enzimáticas, demostrándose que está configuración es más apropiada para la determinación de la concentración de L-lactato en muestras lácteas.

Se ha descrito un método rápido para determinar la capacidad fermentativa de distintas especies de *Lactobacillus*. Este método permite cuantificar esta capacidad, proporcionando una información mas completa del metabolismo de los hidratos de carbono; posibilita el estudio de cepas mutantes suministrando información más completa acerca de las posibles modificaciones en el metabolismo de los fuentes de carbono utilizadas.

Palabras clave: Biosensores microbianos, Biosensores enzimáticos, Polialilamina-osmio, Lactato oxidasa, Glucosa oxidasa, Peroxidasa, *Lactobacillus*, Inmovilización.

# SUMMARY

Enzymatic "wired" biosensors based in the immobilization of one oxidase (glucose oxidase, lactate oxidase or peroxidase) within an redox hydrogel formed by crosslinking of enzyme, polyallylamine containing an osmium complex (PAAOs) and poly(ethylene glycol) (PEG), onto glassy carbon or gold electrodes were constructed. We study the reproducibility and lineal span of these electrodes when they were used as detectors in a FIA system.

To complete their characterization we study the effect of different PAAOs / PEG ratios in the construction of enzymatic biosensores, the effect of pH, temperature and ionic strength. The effect of milk samples and their response were analyzed, these complex analytical matrix affect these electrodes catalytic current.

We designs bilayer bienzyme biosensors; in these system the peroxidase layer, over the electrode ("wired"), are separated from the outer membrane containing lactate oxidase (not "wired"). We study the effect over both layer of milk samples; from these studies a bienzyme electrode configuration was found as the most appropriate array from the determination of L-lactate in milk samples.

A microbial biosensor based on calcium alginate immobilized *Lactobacillus* cells coupled to a pH electrode was developed for quantitative determination of carbohydrate fermentation activity. The evolution of acid production in a continuous flow-stopped bioreactor was monitored for different sugar solution. The procedure can give quantitative results compared to other reported techniques for carbohydrate fermentation pattern from which only qualitative results are obtained.

Key Words: Enzymatic biosensors, Microbial biosensors, Polyallylamine-osmium, Lactate oxidase, Glucose oxidase, Peroxidase, *Lactobacillus*, immobilization.

*A Sebastian y Alejandro*  
*A Fernandez*  
*A mis padres*  
*A mis hermanos, suegra, cuñados y demas...*

"Quién actúa con el fin de alcanzar una meta deberá orientar y dirigir su conducta hacia ésta, buscando medios que le permitan alcanzarla"

Umberto Eco

## Agradecimientos:

A las autoridades del Departamento de Química Biológica que permitieron la realización de este proyecto.

A la Dra. Silvia Moreno y al Dr. Ernesto Calvo, sin su apoyo la concreción de esta tesis en cooperación entre dos departamentos de la FCEN no hubiera existido.

A los docentes-investigadores del Departamento de Química Biológica, con los que compartimos ambas tareas; especialmente a la Dra. Carmen Rivas y su grupo, al que espero conocer mejor.

A mis compañeros del laboratorio de electroquímica, especialmente a Elizabeth Robello, con la que compartimos los pesares y alegrías del típico biólogo aficionado a la electroquímica.

A mis compañeros del ex-laboratorio de Instrumentación Biológica, Marcelo Steimberg y Mario Gomikian, ambiente propicio en el que nació esta tesis.

A Santiago Kocmur, por su amistad y sus consejos y explicaciones, por ser mi químico analítico de cabecera.

A todas la personas que pasan parte de su vida en Ciudad Universitaria, a veces tan distantes y a veces tan cercanos.

Esta Tesis se realizó con el aporte económico del CONICET y de la International Foundation of Science.



# INDICE

1.	INTRODUCCION	
1.1.	Características de los biosensores	1
1.2.	Biosensores enzimáticos y microbianos	3
1.3.	Enzimas	3
1.3.1.	Flavoproteínas, glucosa oxidasa y lactato oxidasa	4
1.3.2.	Hemoproteínas, peroxidasa	5
1.4.	Bacterias del ácido láctico	7
1.5.	Estrategias utilizadas en el diseño de biosensores enzimáticos	8
1.6.	Aplicaciones de los biosensores	9
1.6.1.	Análisis clínicos	10
1.6.2.	Análisis de alimentos y procesos	10
1.6.3.	Análisis de aguas y efluentes	11
1.7.	Objetivos de la Tesis	12
1.8.	Referencias	14
2.	TEORIA DE LOS METODOS ANALITICOS EMPLEADOS	
2.1.	Métodos amperométricos	17
2.1.1.	Cronoamperometría	17
2.1.2.	Voltametría cíclica	19
2.2.	Métodos potenciométricos	21
2.3.	Análisis por inyección en flujo	22
2.3.1.	Algunos parámetros importantes en los sistemas FIA	24
2.4.	Referencias	29
3.	MATERIALES Y METODOS UTILIZADOS	
3.1.	Electrodos y celda electroquímica	30
3.2.	Preparación de las soluciones	30
3.2.1.	Soluciones enzimáticas y patrones	31
3.2.2.	Otras soluciones	31
3.3.	Síntesis del polímero redox	32
3.4.	Sistema de inyección en flujo	33
3.4.1.	Celdas utilizadas	33
3.4.2.	Otros elementos del sistema	34
3.5.	Técnicas de inmovilización	35
3.5.1.	Entrecruzamiento con polialilamina / PEG	35
3.5.2.	Alginato de calcio	36
3.5.3.	Geles de agar-agar	36
3.6.	Métodos microbiológicos	36
3.6.1.	Cepas de <i>Lactobacillus</i> utilizadas	36
3.6.2.	Condiciones y medios de cultivo	37
3.6.3.	Medición de D.O. y conteo de células viables	38
3.6.4.	Método estándar para la caracterización de <i>Lactobacillus</i>	38
3.7.	Electrodos y protocolo utilizado en los ensayos de efecto del pH en las corrientes catalíticas	38
3.8.	Electrodos y protocolo utilizado en los ensayos de efecto de la temperatura en las corrientes catalíticas	40
3.9.	Separación de los componentes de la leche y protocolos utilizados para ensayar su efecto en biosensores enzimáticos	40
3.9.1.	Por peso molecular	40
3.9.2.	Precipitación ácida	41

3.9.3.	Protocolo utilizado para ensayar el efecto de las fracciones sobre los electrodos	41
3.10.	Composición de los electrodos bienzimáticos bicapa diseñados	42
3.11.	Equipamiento electrónico y sistema de adquisición de datos	43
3.12.	Referencias	44
4.	RESULTADOS OBTENIDOS CON ELECTRODOS BASADOS EN GLUCOSA OXIDASA	
4.1.	Introducción	45
4.2.	Pruebas preliminares en celda electroquímica	46
4.3.	Estudios de reproducibilidad y rango de linealidad en el sistema FIA	47
4.4.	Efecto del entrecruzante polietilendiglicidiléter	49
4.4.1.	Efecto de distintas concentraciones de PEG en las corrientes catalíticas y curvas de calibración	49
4.4.2.	Reproducibilidad	52
4.4.3.	Velocidad de respuesta	52
4.4.4.	Ensayos de estabilidad en el sistema FIA	54
4.4.5.	Efecto del entrecruzante en la transferencia de carga en los electrodos	56
4.4.6.	Efecto de soluciones de distinta fuerza iónica sobre la velocidad de transferencia electrónica	58
4.5.	Efecto del pH en las corrientes catalíticas	65
4.6.	Efecto de la temperatura en las corrientes catalíticas	67
4.7.	Referencias	69
5.	RESULTADOS OBTENIDOS CON ELECTRODOS BASADOS EN LACTATO OXIDASA	
5.1.	Mecanismo de reacción	70
5.2.	Efecto de distintas concentraciones de proteína	70
5.2.1.	Propagación de carga y reversibilidad	71
5.2.2.	Modificación de las voltametrías por el agregado de lactato	72
5.2.3.	Estabilidad de la membrana catalítica	74
5.3.	Efecto del pH en las corrientes catalíticas	75
5.4.	Efecto de la temperatura en las corrientes catalíticas	76
5.5.	Referencias	78
6.	RESULTADOS OBTENIDOS CON ELECTRODOS BASADOS EN GLUCOSA Y LACTATO OXIDASA EN MEDIOS COMPLEJOS	
6.1.	Comportamiento en solución tampón pH 7,0 y en presencia de leche	79
6.2.	Efecto de fracciones de la leche en el comportamiento de los electrodos	80
6.2.1.	Fracciones separadas por peso molecular	81
6.2.2.	Fracciones separadas por precipitación ácida	81
6.3.	Ensayo de otros componentes mayoritarios de la leche	82
6.4.	Comportamiento en plasma sanguíneo	83
6.5.	Resultados obtenidos utilizando mediador soluble	84
6.6.	Ensayos con membranas protectoras	87
6.6.1.	Membranas de acetato de celulosa	87
6.6.2.	Membranas de nafión y otras membranas protectoras	88
6.7.	Respuesta y estabilidad en muestras lácteas diluidas en buffer	89
6.8.	Referencias	93

7.	RESULTADOS OBTENIDOS CON ELECTRODOS BIENZIMATICOS BICAPA	
7.1.	Características de los electrodos contruidos	94
7.2.	Ensamblado de la monocapa HRP / PAAOs	96
7.3.	Electrodos bienzimáticos bicapa	99
7.3.1.	Respuesta al L-lactato en batch	100
7.3.2.	Estudio de reproducibilidad y rango de linealidad en el sistema FIA	101
7.3.3.	Estudio de estabilidad en el sistema FIA	103
7.3.4.	Efecto del medio de leche	105
7.3.4.1.	Sobre la capa HRP / PAAOs	106
7.3.4.2.	Sobre la capa LOx / PAA	107
7.4.	Ensayos con electrodos bienzimáticos bicapa con elevada concentración de lactato oxidasa	110
7.4.1.	Efecto de soluciones de distinta fuerza iónica sobre la velocidad de transferencia electrónica	111
7.4.2.	Estabilidad en medios complejos	112
7.5.	Medición de L-Lactato en muestras lácteas y derivados	114
7.6.	Referencias	120
8.	RESULTADOS OBTENIDOS CON BACTERIAS LACTICAS	
8.1.	Arreglo instrumental utilizado en los ensayos en FIA	121
8.2.	Evaluación de agar-agar como medio de inmovilización, utilizando <i>Lactobacillus acidophilus</i>	121
8.3.	Optimización del método de inmovilización y ensayos preliminares utilizando la cepa Y3	124
8.3.1.	Ensayos preliminares en el sistema FIA	126
8.4.	Resultados obtenidos utilizando <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	128
8.4.1.	Optimización de las soluciones carrier para los ensayos en FIA	128
8.4.2.	Optimización de las concentraciones de fuentes de carbono	130
8.4.3.	Viabilidad de las células inmovilizadas	131
8.4.4.	Optimización de las condiciones de ensayo	132
8.4.5.	Caracterización fisiológica	134
8.4.6.	Efecto del medio de precrecimiento	136
8.5.	Aplicación a la caracterización del aislamiento Y3 y cepa tipo <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	138
8.5.1.	Caracterización metabólica de la cepa Y3	138
8.5.2.	Resultados obtenidos con <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	139
8.6.	Relación entre la acidificación y la producción de ácido L-láctico	140
8.7.	Referencias	142
9.	DISCUSION	143
9.1.	Referencias	149
10.	CONCLUSIONES	150

**Los experimentos y resultados de esta Tesis fueron publicados parcialmente, y forman parte, de los siguientes artículos**

1. Effect of the Main Components of Milk on the behavior of Osmium Polyallyllamine based biosensor". Eduardo Cortón y Fernando Battaglini. En preparación
2. "A Rapid Characterization of Lactobacillus Carbohydrate Fermentation Activity using Immobilised Cell Technique". Eduardo Cortón, Mariana Piuri, Fernando Battaglini and Sandra M. Ruzal. Artículo aceptado en *Biotechnollogy Progress*, (N° 014-0199). 09/99.
3. "An Os(byp)<sub>2</sub> ClpyCH<sub>2</sub>NHPoly(allylamine) Hydrogel Mediator for Enzyme Wiring at Electrodes" Claudia Danilowicz, Eduardo Cortón, Fernando Battaglini and Ernesto J. Calvo. *Electrochimica Acta*, 1998, **43**:(23) 3525-3531.
4. "Osmium Complexes Bearing Functional Groups: Building Blocks for Integrated Chemical Systems" Claudia Danilowicz, Eduardo Cortón y Fernando Battaglini. *J. Electroanalytical Chemistry*, 1998, **445**:(1-2) 89-94.

**Experiments and results of this Thesis are partially included in the following articles**

1. Effect of the Main Components of Milk on the behavior of Osmium Polyallyllamine based biosensor". Eduardo Cortón y Fernando Battaglini. En preparación.
2. "A Rapid Characterization of Lactobacillus Carbohydrate Fermentation Activity using Immobilised Cell Technique". Eduardo Cortón, Mariana Piuri, Fernando Battaglini and Sandra M. Ruzal. Artículo aceptado en *Biotechnology Progress*, (N° 014-0199). 09/99.
3. "An  $\text{Os}(\text{byp})_2 \text{ClpyCH}_2\text{NHPoly}(\text{allylamine})$  Hydrogel Mediator for Enzyme Wiring at Electrodes" Claudia Danilowicz, Eduardo Cortón, Fernando Battaglini and Ernesto J. Calvo. *Electrochimica Acta*, 1998, **43**:(23) 3525-3531.
4. "Osmium Complexes Bearing Functional Groups: Building Blocks for Integrated Chemical Systems" Claudia Danilowicz, Eduardo Cortón y Fernando Battaglini. *J. Electroanalytical Chemistry*, 1998, **445**:(1-2) 89-94.

## Abreviaturas más utilizadas

A área

BSA Seroalbumina bovina

CA Acetato de celulosa

D.O. Densidad óptica

ECS Electrodo de calomel saturado

EDTA Acido etilendiaminotetracético

$E_{pa}$  Potencial de pico anódico

$E_{pc}$  Potencial de pico catódico

F faraday, carga de un mol de electrones

FAD flavina adenina dinucleotido

FIA Análisis por inyección en flujo

Glu Glutaraldehído

GOx glucosa oxidasa

HRP peroxidasa

i Corriente

$i_{pa}$  Intensidad de corriente del pico anódico

$i_{pc}$  Intensidad de corriente del pico catódico

$K'_m$  Constante aparente de Michaelis-Menten

$K_m$  Constante de Michaelis-Menten

LAB bacterias del ácido láctico

LOx lactato oxidasa

MRS Medio de cultivo para LABs

PAA Polialilamina

PAAOs Polialilamina-osmio

PEG Polietilenglicidiléter

Tr Tiempo de crecimiento

U.E. Unidades enzimáticas

ufc Unidades formadoras de colonias

v velocidad de barrido, en mV / seg

# 1. INTRODUCCION

## 1.1. Características de los biosensores

Los biosensores se componen por algún tipo de material biológico, células vivas o parte de ellas, asociadas a un transductor que convierte (o traduce) la señal bioquímica producida en una señal eléctrica <sup>1-2</sup>, como puede verse en la figura 1.1.

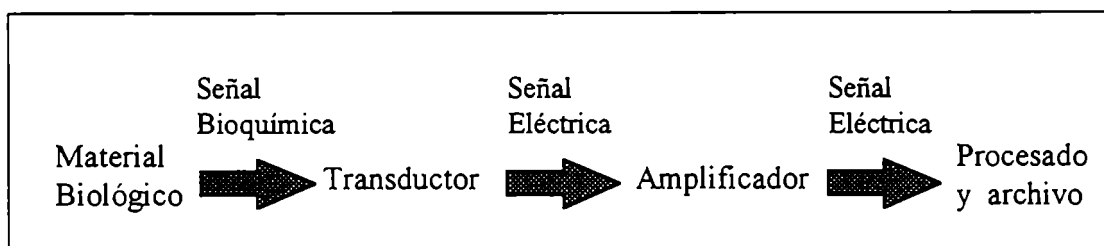


Figura 1.1. Esquema general (bloques) de un biosensor.

La señal eléctrica, proporcional a la concentración del analito, debe ser amplificada convenientemente, ya que las señales producidas por los transductores son en general pequeñas, y enviada a algún sistema de registro de datos y display, cuya función es presentar y/o procesar la información obtenida <sup>3</sup>.

La especificidad del reconocimiento biológico permite que muchos de los biosensores enzimáticos puedan operar en matrices complejas, evitando de esa manera los pasos de purificación que son indispensables en la mayoría de los métodos analíticos convencionales. El material biológico más utilizado son las enzimas, en especial la glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4). Utilizando esta enzima, en 1962 Clark <sup>4</sup> describe el primer biosensor enzimático (también llamados electrodos enzimáticos). Otras enzimas utilizadas en el diseño de biosensores han sido la colesterol oxidasa <sup>5</sup> (EC 1.1.3.6), peroxidasas <sup>6-7</sup> (EC 1.11.1), lactato oxidasa <sup>8-9</sup> (EC 1.1.3.x), urato oxidasa <sup>8-10</sup> (EC 1.7.3.3) entre otras. El segundo material biológico más utilizado son células microbianas intactas, especialmente de levaduras y bacterias; se destaca *Saccharomyces cerevisiae* como el material celular más utilizado en la construcción de biosensores <sup>11</sup>. También se han publicado trabajos utilizando tejidos, células de mamífero, estructuras sensoriales de insectos, etc.

determinación de  $O_2$  y  $H_2O_2$ ; estos dos últimos reactivo y producto, respectivamente, de muchas oxidasas. Transductores potenciométricos y amperométricos han sido utilizados en este trabajo, y se describirán especialmente en el Capítulo 3.

Los fotomultiplicadores y detectores de luz de estado sólido son empleados principalmente cuando se utiliza como material biológico bacterias luminiscentes de origen marino <sup>12</sup>, principalmente del género *Vibrio*, o bien bacterias recombinantes <sup>13</sup> como *Escherichia coli* expresando los genes *lux*. El avance en el área de las fibras ópticas y de las técnicas de ingeniería genética ha impulsado fuertemente desarrollos en este sentido<sup>14</sup>.

Los procesos metabólicos de las células y las reacciones de muchas enzimas proceden liberando un exceso de energía, en forma de calor, al medio circundante. Esto puede ser detectado usando sensores de temperatura; los más empleados actualmente son termistores del tipo NTC (negative temperature coefficient), componentes electrónicos pasivos y pequeños, en los que su resistencia eléctrica disminuye al aumentar la temperatura <sup>15</sup>. En configuración adecuada (medición diferencial con dos termistores en un puente de Weastone), es posible detectar pequeños cambios térmicos. La entalpía de oxidación de la glucosa a gluconato es de  $-80 \text{ kJ / mol}^{-1}$ , lo que ha permitido utilizarla en la construcción de biosensores basados en termistores <sup>16</sup>.

El cambio de masa que se produce cuando un antígeno se une a un anticuerpo <sup>17</sup> puede medirse mediante transductores piezoeléctricos (microbalanzas de cuarzo). En estos biosensores el anticuerpo es fijado sobre un cristal de cuarzo, que es excitado a determinada frecuencia (por ejemplo, 10 MHz), siendo los cambios en la frecuencia de oscilación proporcionales al cambio de masa sobre el cristal.

Los sistemas de medición, como en otras áreas de la química analítica, evolucionan hacia sistemas de inyección en flujo (FIA) que permiten elevado número de muestras / hora, posibilidad de automatización, elevada reproducibilidad y poca dependencia del operador.

La combinación de distintos materiales biológicos (principalmente enzimas y células) con los muy diversos transductores disponibles dan cuenta de la variedad de sistemas analíticos diseñados hasta el presente y sus enormes posibilidades futuras.



## **1.2. Biosensores enzimáticos y microbianos**

La gran mayoría de las publicaciones referidas a biosensores utilizan enzimas como material biológico. Las principales ventajas de los biosensores enzimáticos respecto a los microbianos son las siguientes <sup>18 - 21</sup> :

- I .Elevada especificidad
- II .Tiempos de respuesta breves, en general menores al minuto.
- III .Retornar rápidamente a la línea de base.
- IV .Se pueden usar inhibidores de crecimiento microbiano en las soluciones
- V .Material biológico más homogéneo y predecible

Los biosensores basados en células tienen como inconveniente adicional que los protocolos de inmovilización, conservación y uso del sensor deben proteger la viabilidad de los organismos utilizados. Sin embargo, en algunas aplicaciones los biosensores microbianos son preferibles. Enumeramos a continuación algunas ventajas de ellos respecto a los enzimáticos:

- I .Menos sensibles a la inhibición por componentes de la muestra.
- II .Mas tolerantes a valores subóptimos de pH, temperatura y otros.
- III .La purificación de determinada enzima no es necesaria.
- IV .Puede modificarse la especificidad.

Es interesante discutir el punto IV; la mayoría de los biosensores microbianos son de una muy limitada especificidad; en ciertas situaciones esta falta de especificidad es una ventaja, como por ejemplo en el caso de las mediciones de demanda bioquímica de oxígeno (DBO). También es una característica de mérito cuando se intenta diseñar un sensor que permita evaluar en forma rápida la toxicidad global de una muestra de agua. Utilizando organismos mutantes o recombinantes es posible aumentar la especificidad. En la sección 1.5 se discutirán algunos casos.

## **1.3. Enzimas**

Las enzimas de tipo redox u oxidorreductasas han sido las más empleadas en el diseño de biosensores. La detección de la producción de peróxido o el consumo de oxígeno es sencillo utilizando métodos electroquímicos de tipo amperométricos, lo que

Las enzimas de tipo redox u oxidorreductasas han sido las más empleadas en el diseño de biosensores. La detección de la producción de peróxido o el consumo de oxígeno es sencillo utilizando métodos electroquímicos de tipo amperométricos, lo que explica en parte la utilización de este tipo de enzimas. Otro motivo importante es que utilizando mediadores redox (mediadores solubles, polímeros redox u otros) es posible conducir los electrones producidos o consumidos por la acción enzimática directamente hasta o desde la superficie de un electrodo amperométrico, obteniéndose una señal en corriente directamente proporcional a las moléculas de sustrato que intervienen en la reacción catalizada por la oxidasa.

Es posible clasificar las enzimas redox considerando la naturaleza del grupo prostético asociado; flavina, quinona, hemo o cobre.

### 1.3.1. Flavoproteínas, glucosa oxidasa y lactato oxidasa

Las flavoproteínas contienen FAD (flavina adenina dinucleótido) como grupo prostético. Este grupo generalmente está fuertemente unido a la proteína, en forma no covalente. Durante la acción catalítica, el FAD es en primer lugar reducido por la reacción con el sustrato, y luego reoxidado por reacción con el oxígeno. La forma oxidada de la enzima es de color amarillo, mientras que la forma reducida es incolora, lo que permite seguir el curso de la reacción espectrofotométricamente <sup>22</sup>. La reacción se observa en las ecuaciones 1.1 y 1.2; Enz(FAD) y Enz(FADH<sub>2</sub>) representan respectivamente, la forma oxidada y reducida de la enzima.



La glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4) cataliza la reacción que se observa en la ecuación 1.3.



La fuente más utilizada para obtener esta enzima son hongos, en especial de *Aspergillus niger*. La GOx proveniente de este hongo es un homodímero con un peso

molecular de entre 150 - 180 kDa, conteniendo 2 FAD fuertemente unidos, su separación sólo es posible en condiciones desnaturalizantes. Posee alto contenido de carbohidratos (10 -16 % en peso) principalmente manosa. Se ha determinado su estructura cuaternaria mediante técnicas de difracción de Rayos X. Su estabilidad liofilizada o en solución es muy elevada y resistente a inhibidores<sup>23-24</sup>.

El  $K_m$  para la glucosa a pH 5,6 y a 25 grados centígrados<sup>25</sup> (solución saturada en aire) es de  $3,3 \cdot 10^{-2}$  M o según otros autores<sup>26</sup>  $1,1 \cdot 10^{-1}$  M.

La lactato oxidasa proveniente de *Pediococcus sp.* (EC 1.1.3.x) cataliza la siguiente reacción:

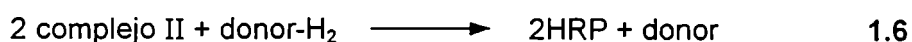


La temperatura optima para esta enzima es de 35° C y pierde rápidamente su actividad a temperaturas superiores a 45 °C. El  $K_m$  utilizando como sustrato L-lactato es de  $7 \cdot 10^{-4}$  M<sup>27</sup>.

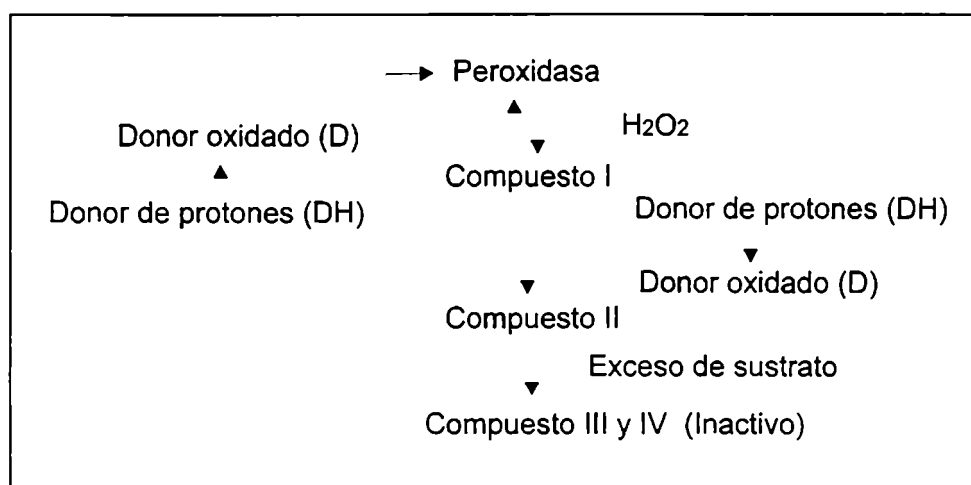
Lactato oxidasa proveniente de otras fuentes (*Mycobacterium smegmatis*) es inhibida competitivamente por aniones inorgánicos (fosfato, sulfato) y por algunos aniones orgánicos monocarboxílicos (formato, acetato)<sup>28</sup>. Resulta fuertemente inhibida por oxalato, inhibición que resulta irreversible en presencia de luz por formación de un aducto unido a la flavina<sup>29</sup>.

### 1.3.2. Hemoproteínas, peroxidasa

Las hemoproteínas contienen Hemo como grupo prostético; este grupo en la peroxidasa de rábano picante (HRP, EC 1.11.1.7) está más débilmente unido, comparado con otras hemoproteínas; una vez separado el grupo prostético, la velocidad de recombinación entre el grupo hemo y la apoproteína es mucho más lenta que en otras proteínas, como la hemoglobina<sup>22</sup>. La reacción que cataliza puede escribirse<sup>30</sup> de manera simplificada según las ecuaciones 1.5 y 1.6.



En el esquema 1.1. puede observarse un modelo acerca de la acción de esta enzima. La HRP reacciona con su sustrato (peróxido), el que oxida al grupo hemo, obteniéndose el Compuesto I; En ausencia de donores de electrones adecuados, el Compuesto I se descompone lentamente. En presencia de donores adecuados, el Compuesto I es reducido en dos pasos secuenciales de transferencia de un electrón; el primero de ellos produce el Compuesto II y un radical libre resultante de la oxidación del donor. Un exceso de sustrato (peróxido) favorece la formación de los Compuestos III y IV, inactivos, resultando en inhibición de la enzima.



Esquema 1.1. Reacción para HRP. Los Compuestos I y II se forman durante el ciclo catalítico. El exceso de peróxido (entre 0,1 y 2 mM, dependiendo del donor de protones utilizado) provoca la inhibición de la enzima.

La peroxidasa de rábano tiene un peso molecular de 44 kD, esta extensivamente glicosilada, contiene calcio y cuatro puentes disulfuro; otras características importantes son la posibilidad de utilizar una amplia variedad de donores de protones, estabilidad y velocidades catalíticas elevadas <sup>31</sup>.

#### 1.4. Bacterias del ácido láctico

Las bacterias del ácido láctico (LABs) son Gram-positivas, generalmente no móviles y no esporulantes, que producen como único o mayor producto de su metabolismo fermentativo ácido láctico. El género está compuesto por unas 50

especies. Los miembros de este grupo son microaerófilos, si bien algunas especies son aerotolerantes, su crecimiento es óptimo en condiciones anaeróbicas o microaeróbicas; concentraciones de CO<sub>2</sub> del 5% estimulan su crecimiento; esta condición impide la utilización de sensores de O<sub>2</sub> o de CO<sub>2</sub> como transductores (figura 1.1). No poseen sistema de transporte de electrones y fosforilación oxidativa, carecen de citocromos y porfirinas, por lo que su obtención de energía está limitada a la fosforilación de ADP a nivel de sustrato. Tampoco poseen catalasas.

Muchos de los miembros de este grupo sólo pueden obtener energía de la oxidación de azúcares y compuestos relacionados, por lo que están restringidos a aquellos hábitats en que los azúcares están presentes. Tienen restringidas habilidades biosintéticas, requiriendo medios de cultivo complejos, conteniendo aminoácidos, vitaminas, purinas y otras moléculas, las que usualmente se logra suplementando los medios de cultivo con extracto de levadura<sup>32-33</sup>.

Poseen metabolismo fermentativo; el producto principal de la degradación de fuentes de carbono es ácido láctico, otros productos adicionales son acetato, etanol, dióxido de carbono, formato y acetato. La principal vía de fermentación para las hexosas involucra la ruta de Embden-Meyerhof (glucólisis), seguida de un paso reductivo para la regeneración del NAD<sup>+</sup>.

En la fermentación homoláctica un mol de hexosa se degrada a 2 moles de ácido láctico (90 % del producto final). En la fermentación heteroláctica 1 mol de hexosa se degrada obteniéndose 1 mol de CO<sub>2</sub>, 1 mol de etanol o ácido acético y 1 mol de ácido láctico. En las primeras, el producto de fermentación es casi exclusivamente ácido láctico, mientras que las segundas producen también etanol y dióxido de carbono. El ácido láctico formado posee la configuración D- o L- dependiendo de la estereoespecificidad de la lactato deshidrogenasa presente en las células. El racemato puede ser formado si están presentes D- y L-lactato deshidrogenasa o por la presencia de enzimas capaces de interconvertir ambos isómeros (racemasas). Algunas especies producen ácido láctico racémico, mientras que otras solo L-lactato (*Lactobacillus acidophilus*), aunque en distintas etapas de crecimiento las proporciones de L y D lactato pueden cambiar.

Los *Lactobacillus* tienen forma de bastones, y son comunes en productos lácteos. Algunas cepas son utilizadas como starters o iniciadores en la producción de yoghurt, cremas, quesos, leches acidófilas y otros productos (chacinados, salsa de soja, pickles, etc).

Una característica fundamental de los *Lactobacillus* es su resistencia a los medios ácidos, muchas de ellas pueden crecer en valores de pH = 4,0. La acidez de los productos fermentados por *Lactobacillus* contribuye de manera importante a la conservación de estos productos. La concentración de ácido láctico puede ser utilizada como criterio de autenticidad en productos fermentados (yoghurt); asimismo concentraciones anómalas de lactato en leche (superiores a una acidez total equivalente a 2 g / l de ácido láctico, estimado usualmente mediante titulación con base) es indicativo de alteración microbiológica.

### 1.5. Estrategias utilizadas en el diseño de biosensores enzimáticos

El cosustrato fisiológico para la glucosa oxidasa (GOx) es el oxígeno, que genera peróxido de hidrógeno (sección 1.3.1.). Los primeros sistemas diseñados para la medición de glucosa se basaron en la detección, de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o bien en la disminución de la concentración de O<sub>2</sub> por la acción de GOx sobre la glucosa utilizando métodos electroquímicos amperométricos<sup>4:34</sup>. Los sensores diseñados de esta manera se han denominado electrodos enzimáticos de primera generación.

Algunos de los inconvenientes que poseen los electrodos enzimáticos de primera generación son los siguientes:

a) La señal de corriente obtenida depende también de la concentración del cosustrato, oxígeno; en presencia de concentraciones elevadas de glucosa el oxígeno se convierte en el limitante de la reacción.

b) El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado acelera la degradación de la enzima<sup>35</sup>; fisiológicamente la presencia de peroxidasas limita la acción del peróxido sobre la enzima.

c) El potencial requerido para medir peróxido en la superficie de un electrodo adecuado (el material más utilizado es platino) es alto (700 mV Vs. ECS), lo que implica mayor posibilidad de que sustancias electroactivas presentes en la muestra se oxiden en la superficie del electrodo, provocando un flujo de corriente no relacionada a la concentración de glucosa en el medio.

d) Los electrodos sensores de oxígeno son sistemas relativamente lentos (tiempo de respuesta en el orden de los minutos), lo que limita fuertemente su capacidad analítica (muestras / hora).

Teniendo en cuenta estos inconvenientes, en la década del '80 se comenzaron a utilizar mediadores artificiales para reemplazar al O<sub>2</sub>, denominándose estos sistemas electrodos enzimáticos (biosensores) de segunda generación. Los mediadores redox son moléculas capaces de oxidar FADH<sub>2</sub> en forma rápida,

reaccionar en forma reversible en la superficie de un electrodo y por lo general más solubles que el oxígeno. Las moléculas más utilizadas son derivados del ferroceno <sup>35</sup> y sales orgánicas <sup>36</sup>.

Estos sistemas han logrado independizar al sistema analítico del cofactor fisiológico de las oxidasas; algunos de sus inconvenientes son que los mediadores solubles en general son inestables, degradándose en poco tiempo (autooxidación); no es posible inmovilizarlos en la superficie de los electrodos (se pierden hacia la muestra) y su comportamiento es altamente dependiente del pH <sup>1</sup>.

En los electrodos enzimáticos denominados de tercera generación la enzima se encuentra inmovilizada en el seno de un polímero redox, que proporciona una vía conductora para los electrones producidos o consumidos en una reacción enzimática. Estos sistemas se denominan "wired" o "cableados", dando cuenta de que las moléculas de enzima transfieren los electrones hasta o hacia la superficie del electrodo mediante un "cable" formado por los centros redox (en nuestro sistema un complejo de osmio) que se encuentran unidos a un polímero. Estos sistemas fueron propuestos por primera vez en el comienzo de la década de los '90 por Heller <sup>37</sup>.

## **1.6. Aplicaciones de los biosensores**

Las aplicaciones más importantes actualmente están en el área de la química analítica clínica. Los sensores basados en glucosa oxidasa, portátiles, con tecnología de tiras (strips) descartables, para uso hospitalario o doméstico (control del nivel de glucemia en insulinodependientes), dan cuenta de casi todo el éxito comercial de los biosensores <sup>38</sup>. En las tiras diseñadas para medir glucosa por ExacTech <sup>39</sup> el electrodo de trabajo contiene glucosa oxidasa y 1,1'-dimetil-3-(1-hidroxi-2-aminoetil) ferroceno, inmovilizados sobre el electrodo de trabajo, y cubiertos con una membrana hidrofílica. Cada tira posee su propio electrodo de referencia y contraelectrodo. Los equipos que miden las tiras (potenciostatos) pesan menos de 30g y proporcionan la concentración de glucosa en sangre entera en unos 30 segundos.

En segundo lugar se encuentran los equipos multianalizadores, que combinan biosensores para glucosa, lactato, urea, colesterol y sensores no enzimáticos (pH, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y otros).

### **1.6.1. Análisis clínicos**

Es el área de mayor impacto comercial. Están bien establecidos los sensores enzimáticos para glucosa, lactato, urea y otros analitos presentes en la sangre. La ventaja de los biosensores son básicamente tres:

- 1) No es necesaria preparación de la muestra, únicamente dilución en algunos casos.
- 2) El resultado analítico se obtiene típicamente en menos de 1 minuto.
- 3) Los volúmenes de muestra son de unos pocos microlitros.

Los desarrollos en el caso de electrodos amperométricos intentan obtener sistemas analíticos de elevada estabilidad en el tiempo y potenciales de trabajo menores con el objeto de disminuir el efecto de posibles sustancias electroactivas presentes en las muestras (ascorbato), que ocasionan señales de corriente espurias; en este sentido son importantes los sistemas bienzimáticos peroxidasa / oxidasa <sup>40-42</sup>.

Otro objetivo importante es el diseño de sensores implantables para monitoreo continuo de glucosa y lactato; en este campo el principal inconveniente es el desarrollo de materiales biocompatibles, la necesidad de esterilizar el dispositivo antes de su implantación, evitar la liberación de productos tóxicos o que provoquen reacciones inmunológicas en el paciente; por último, es necesario evitar los procesos de adsorción de proteínas sobre el sensor, modificando la superficie del sensor o mediante la liberación paulatina de anticoagulantes, como la heparina, con el objeto de prolongar la vida útil del sensor implantado <sup>43</sup>.

### **1.6.2. Análisis de alimentos y procesos**

La industria alimenticia y la farmacéutica tienen la necesidad de controlar procesos en los cuales es muy importante obtener instantáneamente y continuamente (control de proceso) uno o varios parámetros, de por ejemplo, la actividad de las bacterias y hongos en un fermentador (producción de yogur en un caso y de penicilina en el otro) posibilitando conocer exactamente el momento en el cual la reacción debe ser detenida, y en caso de ser necesario como modificar el procedimiento para obtener el producto deseado <sup>44-45</sup>.

Los sistemas analíticos disponibles permiten medir glucosa, sacarosa, fructosa, galactosa, ácido láctico, etanol y otros analitos <sup>46-47</sup>.



Otra aplicación interesante es el desarrollo de sensores de capacidad fermentativa, que permiten caracterizar metabólicamente a una determinada cepa microbiana <sup>48</sup> o bien, para determinada cepa desarrollar medios de cultivo más adecuados o la detección inespecífica de sustancias inhibitoras.

### **1.6.3. Análisis de aguas y efluentes**

La demanda bioquímica de oxígeno (DBO) estima la cantidad de materia orgánica fácilmente degradable por acción microbiológica; es un parámetro importante y la mayoría de las reglamentaciones establecen máximos en efluentes industriales y domiciliarios; basados en electrodos sensores de O<sub>2</sub> y ciertas especies de bacterias y hongos se han propuesto sensores de DBO, algunos de ellos comercializados <sup>49 - 51</sup>.

Sensores basados en acetilcolinesterasa (E.C. 3.1.1.7) permiten estimar la concentración de tóxicos en el medio ambiente que inhiben esta enzima, particularmente sensible a pesticidas organofosforados <sup>52</sup>.

Inmunosensores específicos para distintos pesticidas han sido desarrollados, inmovilizando sobre transductores adecuados anticuerpos anti-pesticida <sup>53 - 54</sup>. Otra posibilidad explotada para la detección de tóxicos en el medio acuático es utilizar enzimas cuyos inhibidores son conocidos y limitados, estimándose su concentración utilizando la disminución de señal a una concentración de sustrato constante <sup>55 - 56</sup>.

Utilizando células microbianas enteras y viables se han propuesto sensores genéricos e inespecíficos de toxicidad en el medio <sup>57 - 58</sup>. Con el objeto de aumentar la especificidad a algún tóxico en particular, se han modificado células bacterianas con plásmidos, en los que se ubica un sistema reporter (operon *lux*) bajo la regulación de el promotor del operon *mer* que se activa específicamente en presencia de Hg<sup>++</sup>, de tal manera que la emisión de luz es proporcional a la presencia de Hg<sup>++</sup> en el medio <sup>59</sup>.

### 1.7. Objetivos de la Tesis

Nuestro laboratorio sintetizó un nuevo complejo de osmio, con una estructura del tipo  $(Os(bpy)_2Cl(pyCHO))^+$  donde bpy es 2,2'-bipiridina y pyCHO es piridina-4-aldehído. Este complejo se une a polialilamina, obteniéndose el compuesto que puede verse en la figura 1.2, donde m y n están en una relación 1:8.

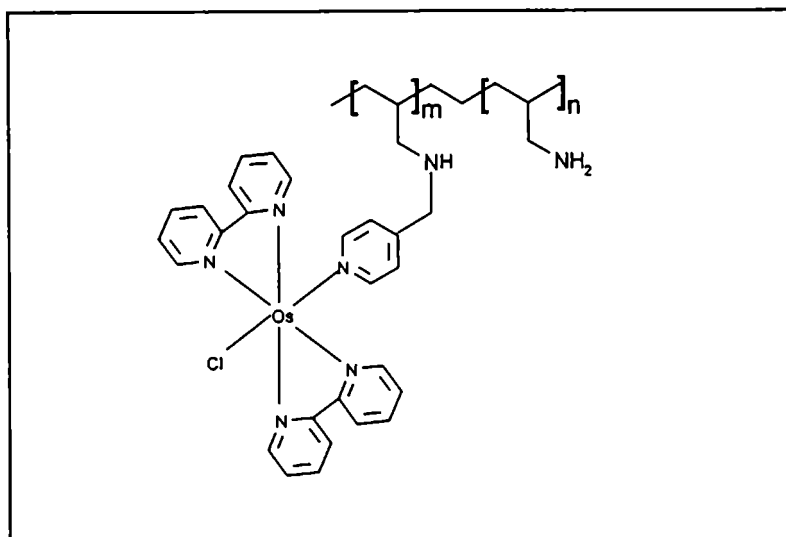


Figura 1.2. Estructura molecular de la polialilamina-osmio (PAAOs)

Algunas características importantes del PAAOs son su elevada estabilidad, y su potencial formal de reducción de 0,26 V vs ECS (a 25 °C en solución acuosa) lo que lo hace adecuado para prácticamente cualquier solvente y cualquier tipo de electrodo.

Un objetivo de esta tesis es ensayar este polímero en la construcción de biosensores enzimáticos cableados ("wired") basados en varias oxidasas. Se estudia su estabilidad frente a distintos pHs, temperatura, fuerza iónica. Se optimiza la concentración de entrecruzante para obtener buena relación entre señal observada y estabilidad en el tiempo. Se prueba que este mediador redox puede usarse en matrices complejas y se lo caracteriza; las publicaciones referidas a la utilización de biosensores enzimáticos en medios distintos a soluciones tampón o plasma sanguíneo son escasas <sup>60</sup>; se propone entonces enfrentar los electrodos construidos con medios reales, y el estudiar las posibilidades de utilizarlos como sistemas analíticos en medios complejos. Como sistema modelo se eligió leche por su importancia industrial.

Se intenta eliminar los pasos previos al análisis (clean-up), que en muestras complejas implican un importante aumento de los costos, reactivos y tiempo necesario para obtener el resultado analítico buscado. La especificidad del material biológico (enzimas) permite reconocer el analito en mezclas complejas; sin embargo, pueden estar presentes en la matriz analítica sustancias que contaminen el electrodo, inhiban o degraden las enzimas utilizadas, impidiendo el funcionamiento del sistema en forma reversible o destruyéndolo irreversiblemente.

Se estudian fermentaciones lácticas utilizando los sensores enzimáticos desarrollados en mediciones *on line* / *ex situ*, por lo que deben ser funcionales y estables en medios basados en leche.

Se realizan estudios para seleccionar condiciones de inmovilización de células del género *Lactobacillus* (LABs), que permitan evaluar la capacidad fermentativa de hidratos de carbono. Utilizando distintas cepas de este grupo (LABs) se evalúan soportes (agar-agar y alginato de calcio) que permiten la inmovilización de células para el diseño de biosensores. La tecnología de células inmovilizadas (TCI) ha sido evaluada en cuanto su potencial aplicación en la industria lechera <sup>61</sup>. Estas aplicaciones incluyen la acidificación de leche cruda con anterioridad a la ultrafiltración, la producción de yoghurt y otras.

El empleo de esta tecnología (TCI) permite el diseño de biosensores para el desarrollo de técnicas de evaluación de actividad fermentativa y caracterización de cepas de LABs utilizando sistemas FIA y detección potenciométrica del ácido láctico formado. Se comparan las técnicas desarrolladas con aquellas establecidas para la caracterización de LABs.

## 1.8. Referencias

1. Cass, A.E.G.; Biosensors. Oxford University Press, Oxford (1990) .
2. Lowe, C.R.; *Biosensors* **1** (1985) 3.
3. Malmstadt, H.V.; Enke, C.G.; Crouch, S.R.; Electronics and Instrumentation for Scientists. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. , New York (1981).
4. Clark, L.C. Jr.; Lyons, C.; *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **102** (1962) 29.
5. Ball, M.R.; Frew, J.E.; Green, M.J.; Hill, H.A.; *Proc. Electrochem. Soc* **86** (1986) 7.
6. Wendzinsky F.; Grundig, B.; Renneberg, R.; Spener, F.; *Biosens. Bioelectron.* **12** (1997) 43.
7. Mulchandani, A.; Pan, S.; *Anal. Biochem.* **267** (1999) 141.
8. Laurinavicius, V.A.; Kulys J.J.; Gureviciene, V.V.; Simonavicius K.J.; *Biomed. Biochim. Acta* **49** (1989) 905.
9. Yang Q.; Atanasov P.; Wilkins, E.; *Biosen. Bioelectron.* **14** (1999) 203.
10. Dellaciana, L.; Caputo, G.; *Clinical Chemistry* **42** (1996) 1079.
11. Rechnitz, G.; Ho, M.Y.; *J. Biotechnol.* **15** (1990) 201.
12. Virta M.; Lampinen J.; Karp M.; *Anal. Chem.* **67** (1995) 667.
13. Selifonova, O.; Burlage R.; Barkay T.; *Applied and environmental Microbiology* **59** (1993) 3083.
14. Blum L.J.; Gautier S.M.; Coulet P.R.; *J Biolumin. Chemiluminl.* **4** (1989) 543.
15. Dollimore D.; *Anal. Chem.* **68** (1996) R63.
16. Xie B.; Danielsson, B.; *Analytical letters* **29** (1996) 1921.
17. Minunni M.; Mascini M.; Guilbault G.G.; Hock B.; *Analytical Letters* **28** (1995) 749.
18. Guilbault G.G.; Luong J.H.; *Source Chimia* **42** (1988) 267.
19. Rechnitz G.; Ho M.Y.; *J. Biotechnol.* **15** (1990) 201.
20. Korpan Y.I.; Elskaya A.V.; *Biochemistry - Moscow* **60** (1995) 1517.
21. Harrowing P.; *Analyst* **121** (1996) N15.
22. Biological Oxidations. Singer T. P. Editor. Interscience Publishers, New York (1968).
23. Hecht, H.J.; Kalisz, H.M.; Hendle J.; Schmid R.D.; Schomberg, D. *J. Mol. Biol.* **229** (1993) 153.
24. Wilson, R.; Turner A.P.F.; *Biosensors and Bioelectronics* **7** (1992) 165.
25. Swoboda, B.E.P.; Massey V.; *J. Biol. Chem.* **240** (1965) 2209.
26. Gibson, Q.R.; Swoboda, B.E.P.; Massey V.; *J. Biol. Chem.* **239** (1964) 3927.
27. Radola B.J.; Delincee, H.; *Ann. Technol. Agro.* **21** (1972) 473.
28. Lockridge, O.; Massey M.; Sullivan, P.A.; *J. Biol. Chem.* **247** (1972) 8097.

29. Ghisla, S.; Massey V.; *J. Biol. Chem.* **250** (1975) 577.
30. George, P.; *Nature* **169** (1952) 612.
31. Ryan O.; Smyth M.R.; Fagain C.O.; *Essays Biochem.* **28** (1994) 129.
32. Senthuran, A.; Senthuran, V.; Mattiasson, B.; Kaul, R.; *Biotechnology and Bioengineering* **55** (1997) 841.
33. Berg, R.W.; Sandine, W.E.; Anderson, A.W.; *Appl. Environ. Microbiol.* **42** (1981) 786.
34. Ianniello R.; Yacynych A.; *Anal. Chem.* **53** (1981) 2090.
35. Cass, A.; Davis, G.; Green, M.; Hill, H.; *J. Electroanal. Chem.; Interfacial Electrochemistry* **190** (1985) 117.
36. Alberly, W.; Barlett, P.; *J. Electroanal. Chem.; Interfacial Electrochemistry* **194** (1985) 211.
37. Gregg, B.; Heller, A.; *Anal. Chem.* **62** (1990) 258.
38. Turner, A.P.F.; Pickup, J.C.; *Biosensors* **1** (1985) 85.
39. MediSense Inc.; Abingdon, England y Cambridge, Mass., USA
40. Ohara T.J.; Rajagopalan R.; Heller A.; *Anal. Chem.* **66** (1994) 2451.
41. Kenausis G.; Chen Q.; Heller A.; *Anal. Chem.* **69** (1997) 1054.
42. Khan G.F.; Wernet W.; *Anal. Chem.* **69** (1997) 2682.
43. Csoregi E.; Quinn C.P.; Schmidtke D.W.; Lindquist S.E.; Pishko M.V.; Ye L.; Katakis I.; Hubbell J.A.; Heller A.; *Anal. Chem.* **66** (1994) 3131.
44. Liebs P.; Riedel K.; Pfeiffer D.; Zimare U.; Lietz F.; Scheller F.; *Acta Biotechnol.* **9** (1989) 534.
45. Deshpande S.S.; Rocco R.M.; *Food Technology* **48** (1994) 146.
46. Park J.K.; Shin M.C.; Lee S.G.; Kim H.S.; *Biotechnology Progress* **11** (1995) 58.
47. Liebs P.; Riedel K.; Pfeiffer D.; Zimare U.; Lietz P.; Scheller F.; *Acta Biotechnol.* **9** (1989) 534.
48. Riedel C.; Kunze G.; *Microbiology Research* **152** (1997) 233.
49. Gaisford W.C.; Richardson N.J.; Haggett B.G.; Rawson D.M.; *Biochem. Soc. Trans.* **19** (1991) 15.
50. Galindo E.; Garcia J.L.; Torres L.G.; Quintero R.; *Biotechnol. Tech.* **6** (1992) 399.
51. Li Y.R.; Chu J.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **28** (1991) 855.
52. Evtugyn G.A.; Budnikov H.C.; Nikolskaya E.B.; *Analyst* **121** (1996) 1911.
53. Khomutov S.M.; Zherdev A.V.; Dzantiev B.B.; Reshetilov A.N.; *Analytical Letters* **27** (1994) 2983.
54. Bright F.V.; Betts T.A.; Litwiler K.S.; *Anal. Chem.* **62** (1990) 1065.

55. Ayyagari M.S.; Kamtekar S.; Pande R.; Marx K.A.; Kumar J.; Tripathy S.K.; Akkara J.; Kaplan D.L.; *Biotechnology Progress* **11** (1995) 699.
56. Zhao J.G.; Henkens R.W.; Crumbliss A.L.; *Biotechnology Progress* **12** (1996) 703.
57. Nakanishi K.; Ikebukuro K.; Karube I.; *Applied Biochemistry and Biotechnology* **60** (1996) 97.
58. Rozzi A.; Tomei M.C.; Dipinto A.C.; Limoni N.; *Biotechnology and Bioengineering* **55** (1997) 33.
59. Selifonova O.; Barkay T.; *Applied and Environmental Microbiology* **60** (1994) 3503.
60. Hale P.D.; Boguslavsky L.I.; Inagaki T.; Karan H.I.; Lee S.H.; Skotheim T.A.; *Anal. Chem.* **63** (1991) 677.
61. Champagne C.P.; Lacroix C.; Sodini-Gallot I.; *Crit. Rev. Biotechnol.* **14** (1994) 109.

## 2. TEORIA DE LOS METODOS ANALITICOS EMPLEADOS

### 2.1. Métodos amperométricos

Los métodos amperométricos utilizados son del tipo potencioestáticos; en estos se fija un potencial entre el electrodo de referencia y el de trabajo, de tal manera de que se oxiden o reduzcan las especies de interés, midiéndose la corriente que circula entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo.

#### 2.1.1. Cronoamperometría

En este método se fija el potencial en un valor donde la especie de interés sufre una reacción redox en la superficie del electrodo. El potencial se mantiene constante a lo largo del tiempo, como se observa en la figura 2.1. La variable de salida es corriente, la que es proporcional a la concentración de la especie que se reduce u oxida en la superficie del electrodo de trabajo, según la ecuación 2.1.:

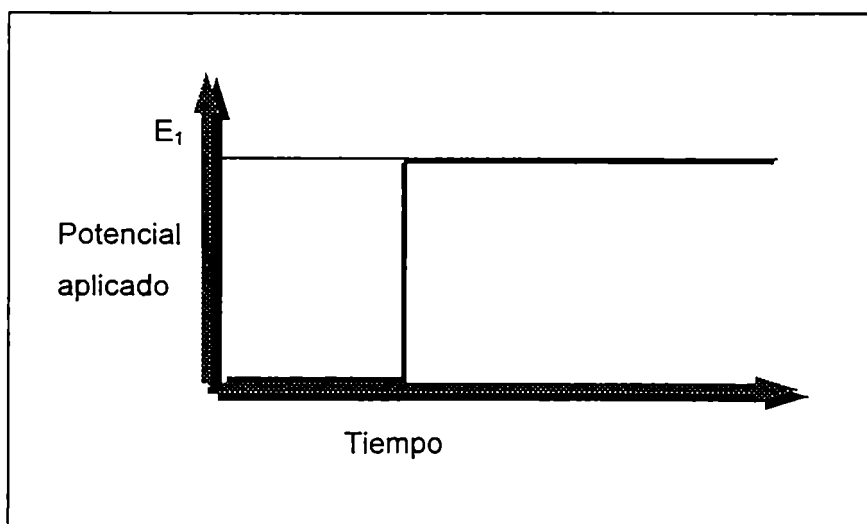


Figura 2.1. En las técnicas cronoamperométricas, el potencial se mantiene a un valor constante.

La variación de corriente en el tiempo para un electrodo estacionario dependerá del potencial aplicado y la geometría del electrodo. A un sobrepotencial lo suficientemente mayor que el de la cupla en estudio la corriente observada dependerá del proceso de difusión y de la geometría del electrodo. Un electrodo plano puede aproximarse a un plano infinito y la corriente disminuirá con el tiempo, mientras que para una gota de mercurio (electrodo de gota colgante) puede aproximarse a una esfera y la corriente tenderá a un valor constante <sup>1-3</sup>. En el caso de un electrodo plano,

$$i = nFAD^{1/2}C/(\pi t)^{1/2} \quad 2.2$$

En donde  $i$  es la intensidad de corriente,  $n$  el número de electrones intercambiados,  $A$  el área del electrodo,  $D$  el coeficiente de difusión de la especie electroactiva,  $C$  la concentración de la especie electroactiva y  $t$  el tiempo transcurrido desde el salto de potencial.

En nuestro caso, las especies redox se encuentran adsorbidas en la superficie del electrodo (PAAOs, un polímero redox), por lo que se registra una rápida caída de la corriente, hasta que esta toma valores constantes y cercanos a cero cuando el polímero redox cambia su estado de oxidación.

En el caso estudiado en este trabajo la enzima redox regenera la especie oxidada en el electrodo, como se observa en la ecuación 2.3.



En presencia de exceso de sustrato la concentración de enzima reducida permanece constante e igual a la concentración total de la enzima, por lo que la reacción puede considerarse de pseudo primer orden. La corriente será proporcional a:

$$i = nFAD^{3/2}k^{1/2}C_E^{1/2}C \quad 2.4$$



Donde  $k$  es la constante de velocidad de la ecuación 2.3,  $C_E$  es la concentración total de enzima. En el caso de que el sistema no este saturado de sustrato la expresión se complica <sup>4</sup>, pero para reacciones rápidas la corriente es proporcional a la concentración de sustrato, y de ahí su potencial valor como técnica analítica.

### 2.1.2. Voltametría cíclica

En esta técnica el potencial aplicado a los electrodos varia en función del tiempo, como puede verse en la figura 2.2. La velocidad de esta variación puede ser regulada por la mayoría de los equipos en un rango de 1 V / seg - 1 mV / seg, así como la amplitud de la ventana de potencial ( $E^2 - E^1$ ).

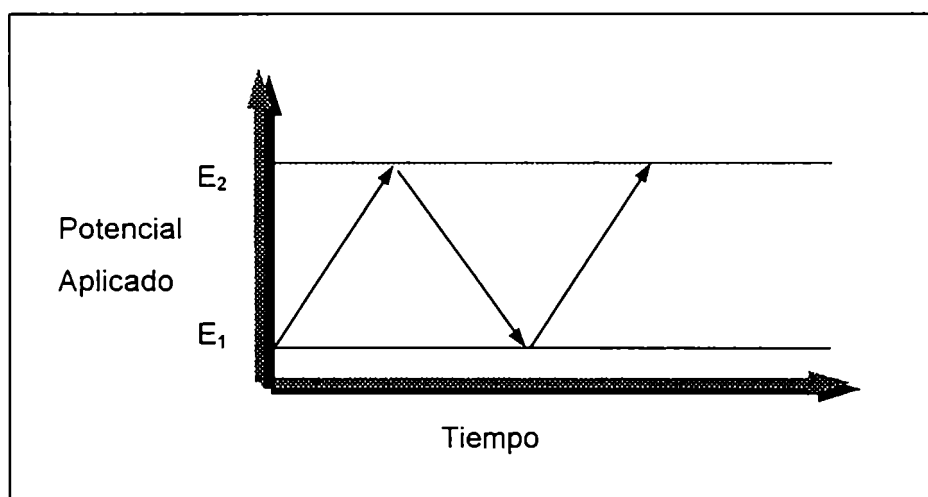
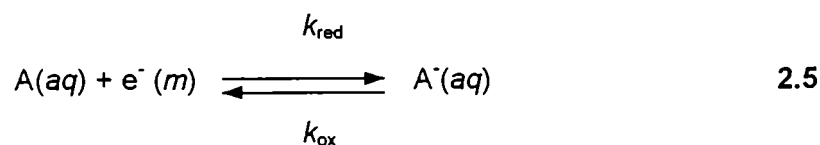


Figura 2.2. Variación del potencial aplicado en las técnicas de voltametría cíclica.

La respuesta del sistema a este cambio de potencial en el tiempo se registra en gráficos de corriente vs potencial, obteniéndose representaciones gráficas como la de la figura 2.3. En esta figura se observan algunos de los parámetros habitualmente considerados al estudiar una voltametría cíclica <sup>3</sup>. Es importante también la separación entre los picos anódico y catódico, expresada como  $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$ .

Si consideramos un proceso redox de transferencia de un electrón a través de un electrodo metálico ( $m$ ) a una especie en solución acuosa ( $aq$ ),



Es obvio que esta reacción procederá si el electrodo puede actuar como una adecuada fuente o sumidero de electrones, dependiendo del potencial aplicado. La forma de la voltametría cíclica de este sistema dependerá de la reversibilidad de la cupla redox  $A / A^{-}$ , durante el barrido o hemiciclo catódico se acumula la forma  $A^{-}$ , oxidada, la que podrá reducirse durante el hemiciclo anódico<sup>3:5</sup>.

Los procesos de transferencia de electrones observados por técnicas de voltametría cíclica pueden ser reversibles, irreversibles o cuasireversibles. Un proceso reversible de transferencia de un electrón para una especie en solución puede ser diagnosticado siguiendo los siguientes criterios<sup>3</sup>:

- a)  $\Delta E_p = 59 \text{ mV}$  si la temperatura es de  $25^{\circ}\text{C}$
- b)  $i_{pa} / i_{pc} = 1$
- c)  $E_{pa}$  es independiente de  $V$ .

En los procesos de tipo irreversible no cumplen con las características enunciadas, y  $A^{-}$  solo puede ser reconvertido en  $A$  a potenciales mucho más catódicos que los observados en los procesos reversibles. Los procesos reversible e irreversibles son situaciones límites; se ha empleado el término cuasi-reversibles para reacciones que muestran limitaciones cinéticas para la transferencia de electrones.

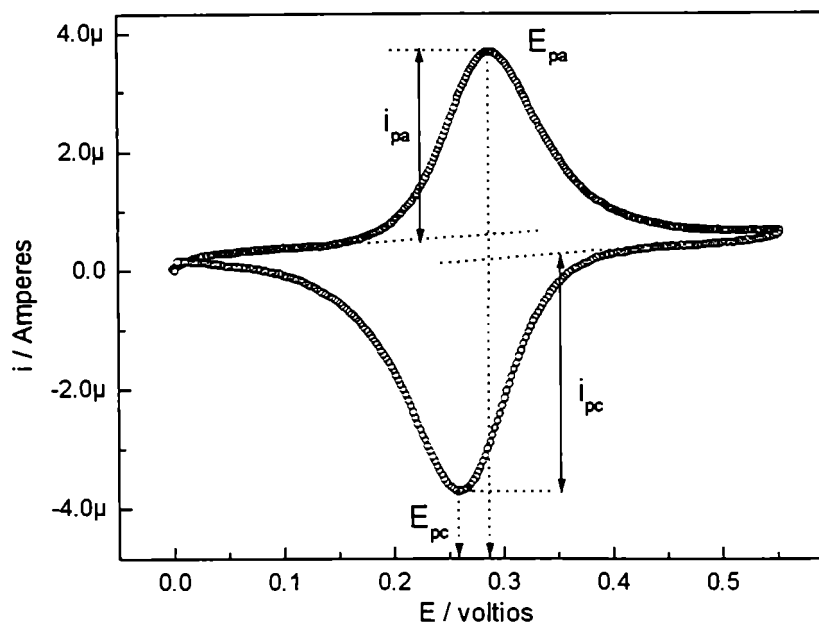


Figura 2.3. Voltametría cíclica típica de una especie adsorbida sobre un electrodo de trabajo. Se indican algunos parámetros importantes para su análisis.

## 2.2. Métodos potenciométricos

Los métodos potenciométricos se basan en la medición de la diferencia de potencial que aparece entre dos electrodos adecuados (denominados electrodo de medición y electrodo de referencia) en condiciones tales que la circulación de corriente entre los electrodos sea prácticamente nula.

El electrodo de referencia debe tener un potencial estable e independiente de la composición de la solución en estudio; los más utilizados son el electrodo de calomel saturado (ECS) formado por Hg metálico y  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$  en equilibrio con una solución saturada de KCl, o el de plata-cloruro de plata ( $\text{Ag} / \text{AgCl}$ ) que está compuesto por un alambre de plata (cubierto con una capa de AgCl) sumergido en una solución de KCl saturada en AgCl <sup>6</sup>.

Los métodos potenciométricos tienen muchas aplicaciones analíticas, ya que es posible construir electrodos de medición o indicadores sensibles a diversos analitos; el sistema más utilizado es el electrodo indicador de vidrio sensible a la

actividad de protones, conocido como electrodo de pH. El pH es una medida de la acidez de un medio acuoso diluido, y está definido de la siguiente manera <sup>1</sup> :

$$\text{pH} = -\log_{10}a_{\text{H}_3\text{O}^+} \approx -\log_{10}[\text{H}_3\text{O}^+] \quad 2.6$$

Donde  $a_{\text{H}_3\text{O}^+}$  es la actividad de  $\text{H}^+$ , que en soluciones diluidas puede aproximarse a la concentración. Otros electrodos potenciométricos permiten sensar  $\text{N}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Li}^+$  y  $\text{Ag}^+$  entre otros cationes, esta selectividad se ha logrado modificando la composición de la membrana de vidrio. Sistemas potenciométricos detectores de gases ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{SO}_2$  y otros) se han desarrollado intercalando entre los electrodos y el medio una cámara con una solución electrolítica adecuada y una membrana externa permeable a los gases.

Un sistema moderno para la medición de pH, y que ha sido utilizado para la construcción de biosensores debido a su pequeño tamaño y mayor resistencia mecánica son los sensores basados en transistores tipo FET (transistores de efecto de campo), componentes electrónicos de estado sólido y pequeño tamaño . En los transistores (construidos con semiconductores) la corriente que circula entre la entrada y la salida esta regulada por una compuerta (gate). Si esta compuerta es sensible a los  $\text{H}^+$ , la corriente que circula por el componente se hace dependiente de la concentración de  $\text{H}^+$ . Un inconveniente de estos sistemas es que es mas complejo el equipamiento electrónico (pH-metro) asociado a estos electrodos. Genéricamente, estos transistores sensibles a iones se denominan ISFET, transistores de efecto de campo ion selectivos, y su utilización como transductores en biosensores microbianos y enzimáticos esta en aumento <sup>7-8</sup> .

### 2.3. Análisis por inyección en flujo

El análisis por inyección en flujo (FIA) es un método por el cual un detector monitorea continuamente una propiedad de un fluido en movimiento, como la absorbancia a una determinada longitud de onda. Cuando se inyecta una muestra esta es arrastrada por el fluido, y al pasar frente al detector este registra un cambio en la variable medida.

Los componentes mínimos de un sistema FIA son <sup>9</sup> :

a) Sistema de propulsión del fluido; en sistemas de baja presión, como el utilizado en este trabajo, generalmente se utilizan bombas peristálticas. Este sistema de bombeo tiene el inconveniente de que es pulsátil; bombas con pocos rodillos producen un flujo inadecuado para los sistemas FIA. De ser necesario se utilizan diversos sistemas amortiguadores de las pulsaciones en el fluido impulsado.

b) Sistema de inyección de muestra; las de uso más general son las válvulas inyectoras de seis vías y dos posiciones. Permiten insertar en el flujo de carrier la muestra, cuyos volúmenes pueden ser seleccionados en forma precisa utilizando lazos (loops) de diferentes volúmenes.

c) Sistema de detección; son detectores de uso frecuente los electroquímicos y espectrofotométricos. Deben originar una respuesta proporcional, dentro de ciertos límites, a la concentración del analito. Generalmente el sistema de detección se encuentra en una celda de flujo adecuada.

d) Sistema de adquisición de datos, registro y procesado; las interfaces analógicas/digitales son muy adecuadas para este uso, permitiendo registros continuos y un conveniente formato digital de registro, lo que facilita el análisis de la información obtenida.

Los primeros sistemas de este tipo fueron los autoanalizadores (AutoAnalyzer) producidos por Technicon hace cuarenta años, para la determinación de glucosa y urea en sangre. El aumento en el uso de equipos de cromatografía líquida de alta performance (HPLC, FPLC), cromatografía gaseosa (GC) y otras técnicas cromatográficas han generalizado, actualmente, algunas de las bases o principios de funcionamiento de estas técnicas analíticas <sup>10</sup>.

Algunas de las ventajas que poseen los sistemas FIA respecto a la medición discreta de muestras (batch) son que estas técnicas son fácilmente automatizables, permitiendo el uso de sistemas muestradores, que la velocidad o el tiempo necesario por análisis es muy pequeño, pudiendo ser menor al minuto, y también es importante el ahorro de reactivos, al operar en escala normalmente de microanálisis <sup>11 - 13</sup>.

En la tabla 2.1 se consideran estos aspectos.

Análisis convencionales (Batch)	Análisis por inyección en flujo (FIA)
Mayor	Menor
⇒ consumo de muestra	⇒ consumo de muestra
⇒ consumo y costo de reactivos	⇒ consumo y costo de reactivos
⇒ residuos	⇒ residuos
⇒ contaminación, daño ambiental	⇒ contaminación, daño ambiental
⇒ riesgo laboral	⇒ riesgo laboral
	Elevada frecuencia de muestreo
	Mayor exactitud y reproducibilidad
	Aumento de selectividad
	Versatilidad y simplicidad

Tabla 2.1. Comparación de las principales características de los métodos FIA respecto a los métodos convencionales, realizados en batch.

### 2.3.1. Algunos parámetros importantes en los sistemas FIA

#### Señal.

En estos sistemas, el concepto de estado de equilibrio es reemplazado por el de señal transtoria, que esta relacionada con el pasaje frente al detector de la muestra, y que tiene la forma de un pico (figura 2.4).

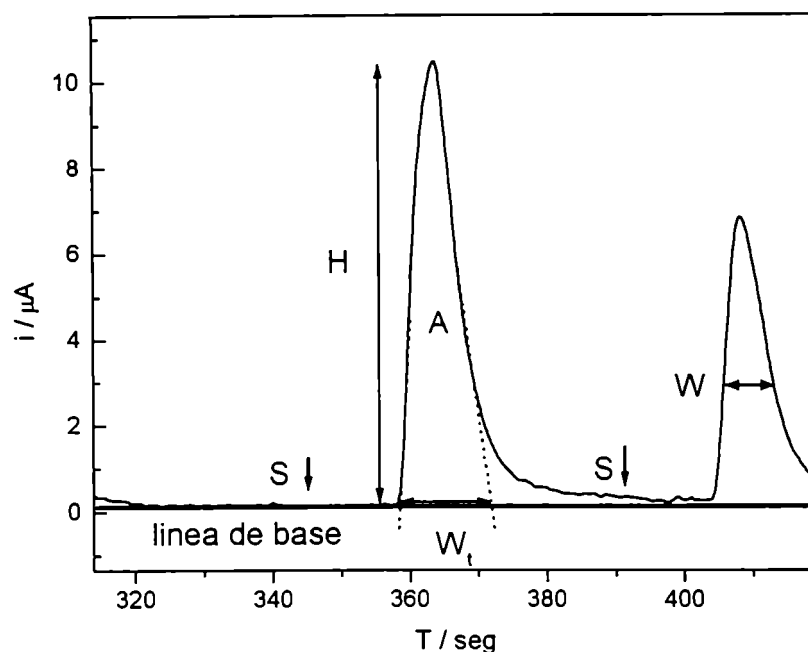


Figura 2.4. Señales producidas en un sistema FIA. El tiempo entre la inyección de la muestra  $S$  y el desarrollo de los picos depende del volumen de carrier entre el sistema de inyección y el detector, así como de la velocidad de flujo.

La altura  $H$ , el ancho  $W$ , o el área  $A$  contienen información analítica<sup>9</sup>. Debido a que se puede medir fácilmente y está directamente relacionada con la respuesta del detector, la más utilizada de estas magnitudes es la altura de pico  $H$ , donde:

$$H = kC \quad 2.7$$

donde  $k$  es la constante de proporcionalidad y  $C$  la concentración del analito. En la figura 2.4 el punto de inyección de muestra se simboliza con la letra  $S$ ,  $W$  es el ancho del pico; es habitual medirlo a "media altura", es el ancho en la mitad de la altura del pico, aunque es válido medirlo en otras alturas.  $W_t$  es el ancho de pico en la línea de base (una de las maneras posibles de cuantificarlo), y se obtiene extrapolando las ramas ascendente y descendente del pico hasta la línea de base; en el caso de un pico gaussiano  $W_t$  abarcaría el 99,7 % del área total bajo el pico ( $\mu \pm 3\sigma$ );  $W_t$  limita el número máximo de muestras que pueden ser discriminadas en un sistema FIA.

### Coeficiente de dispersión.

Cuando la muestra es inyectada en la corriente del carrier, esta es empujada por el carrier, y en el camino al detector y dentro del detector sufre procesos de dispersión que dependen fundamentalmente de la geometría y diámetro de las tubuladuras y de la velocidad de flujo del carrier. Esto da como resultado la formación de un gradiente de concentración, con la forma de un pico, con un continuo de concentraciones desde un máximo central, como se observa en la figura 2.5.

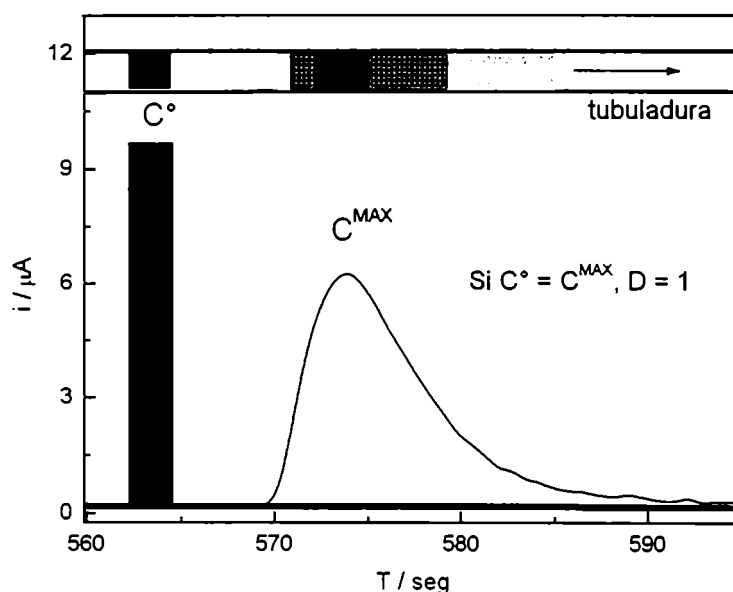


Figura 2.5. Una muestra homogénea de concentración  $C^\circ$  sufre procesos de dispersión.

Con el objetivo de diseñar y optimizar un sistema FIA, es necesario conocer cuanto de la muestra original es diluida en el camino hacia el detector. Se ha definido el coeficiente de dispersión  $D$ , como la relación entre la concentración en la muestra del analito antes y después de que el proceso de dispersión haya ocurrido<sup>9</sup>.

$$D = C^\circ / C \quad 2.8$$

Esto es, cuando la muestra se ha diluido 1:1 con el carrier,  $D = 2$ . Arbitrariamente, se han clasificado los valores de dispersión de la siguiente manera:



Limitada.  $D = 1-3$

Mediana.  $D = 3-10$

Grande.  $D > 10$

Los fenómenos responsables de la dispersión pueden ser clasificados en dos tipos de procesos que ocurren simultáneamente, físicos y químicos. El resultado final de la dispersión es una disminución de la señal que el mismo procedimiento generaría empleando una técnica de batch, surgiendo entonces el concepto de recuperación de señal, que es la relación existente entre la señal de equilibrio y la señal del sistema FIA<sup>9</sup>.

En la figura 2.5 se puede observar como una muestra originalmente homogénea se dispersa durante su movimiento a través del sistema de flujo, cambiando la forma del gradiente de concentración original ( $C^0$ ) hacia un gradiente continuo de concentraciones, con una concentración máxima ( $C^{max}$ ), igual o inferior a  $C^0$ .

#### Relación entre la altura de pico y el volumen de muestra.

Para unas dadas condiciones de velocidad de flujo del carrier, diámetro de las tubuladuras y configuración del sistema FIA, al inyectar mayores volúmenes de muestra la altura de los picos o de la señal registrada también aumenta, hasta que se alcanza un nivel máximo ("estado de equilibrio"). En este estado final, la señal medida debe corresponder a la señal que entregaría una muestra sin diluir ( $C^0$ ) y el factor de dispersión sería  $D = 1$ .

Tratar de alcanzar las condiciones de  $D = 1$  implica, sin embargo, la utilización de volúmenes relativamente grandes de muestra, y por lo tanto un ensanchamiento proporcional de los picos, requiriendo tiempos mayores por análisis y limitando el número de muestras que puede ser procesada por unidad de tiempo. Los tiempos necesarios para lavar el sistema de la muestra y regresar a los niveles de línea de base se incrementan mucho. Entonces, en un diseño racional de un sistema FIA se considera que el máximo volumen de muestra debería producir una señal no superior al 50% de la señal máxima ( $C^{max}$ ), o expresado de otra manera,  $D \geq 2$ .

### Relación entre el ancho del pico, el factor de dispersión y la frecuencia de muestreo.

El ancho de los picos tiene un significado de gran importancia, ya que está directamente relacionado con la duración del ciclo de muestreo, la cantidad de muestras por unidad de tiempo que pueden ser analizadas, el consumo de reactivos y de tiempo. Para evitar que la dispersión sea elevada, la longitud de las tubuladuras entre la válvula de inyección y el detector no deben ser demasiado importantes, y no deben producirse turbulencias en adaptadores o conectores. El volumen inyectado debe ser el menor posible, de acuerdo a los límites de detección deseados y a consideraciones prácticas.

## 2.4. Referencias

1. Skoog D.; Leary J.; Análisis Instrumental. McGraw-Hill, New York, 1994.
2. Fisher A.; Electrode Dynamics. Oxford University Press, Oxford, 1996.
3. Bard A.; Faulkner L.; Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications. Willey, New York, 1980.
4. Battaglini, F.; Tesis Doctoral, 1989.
5. Cass A. E.; Biosensors. Oxford University Press, Oxford, 1990.
6. Compton R.; Sanders G.; Electrode Potentials. Oxford University Press, Oxford, 1998.
7. Brand U.; Brandes L.; Kullik T.; Reinhardt B.; Ruether F.; Scheper T.; Schuegerl K.; Wang S, *et al.*; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36** (1991) 167.
8. Korpan Y.I.; Gonchar M.V.; Starodub N.F.; Sibirnyi A.A.; Elskaya A.V.; *Biochemistry-Moscow* **59** (1994) 141.
9. Ruzicka J.; Hansen E.; Flow Injection Analysis. John Wiley & Sons, New York, 1988.
10. Adeyolu O.; Iwuoha E.I.; Smyth M.R.; Leech D.; *Analyst* **121** (1996) 1885.
11. Pilloton R.; Mignogna G.; Fortunato A.; *Analytical Letters* **27** (1994) 833.
12. Prodromidis M.I.; Tzouwarakaryanni S.M.; Karayannis M.I.; Vadgama P.M.; *Analyst* **122** (1997) 1101.
13. Scheper T.H.; Hilmer J.M.; Lammers F.; Muller C.; Reinecke M.; *Journal of Chromatography A* **725** (1996) 3.

### 3. MATERIALES Y METODOS UTILIZADOS

#### 3.1. Electroodos y celda electroquímica

Como electroodos de medición se utilizaron electroodos de carbón vítreo de 5,5 mm de diámetro, superficie igual a 23,76 mm<sup>2</sup> (Tokai, Japón), o bien electroodos de oro de 3 mm de diámetro (7,07 mm<sup>2</sup>) embujados en resina epoxi (Araldite, Ciba Geigy). La resina epoxi se torneo, obteniéndose electroodos con rosca macho para ser utilizados en la celda de flujo que se describe más adelante. Los electroodos se prepararon según se detalla:

I. - Se pulieron con papel de granulometria decreciente hasta 1200.

II.- Se pulieron con alúmina de 0,1 y 0,03  $\mu\text{m}$  de diámetro de partícula y luego fueron sonicados 30 segundos en agua destilada.

Antes de cada experiencia se repetía la etapa II.

Como electroodos de referencia se utilizaron electroodos de calomel saturado (ECS) contruidos en el laboratorio y controlados con un electrodo de referencia patrón de calomel saturado. Se utilizó también electroodos de referencia plata / cloruro de plata (Ag / AgCl) comerciales, con unión porosa de vicor (BAS).

Los contraelectroodos fueron de platino, en forma de lamina o malla, incluidos en un tubo de vidrio.

Los electroodos de pH utilizados fueron del tipo monobaston, cuerpo de epoxi, con electrodo de referencia de calomel saturado (Cole-Parmer).

Las mediciones en condiciones estacionarias se realizaron utilizando una celda electroquímica de vidrio para tres electroodos (trabajo, referencia y contraelectrodo), con camisa de agua que se utilizó en los ensayos a diferentes temperaturas.

#### 3.2. Preparación de las soluciones

Se utilizó en todos los casos agua destilada calidad Milli-Q (sistema de purificación Millipore). Todas las soluciones se prepararon utilizando reactivos de calidad analítica.

### 3.2.1. Soluciones enzimáticas y patrones

Las soluciones enzimáticas se prepararon de la siguiente manera; lactato oxidasa (LOx, EC 1.1.3.x) proveniente *Pediococcus* Sp. (Sigma Chemical Co.), en forma de sólido liofilizado, 34 Unid/mg (donde 1 unidad convierte 1,0  $\mu$ moles de L-lactato a piruvato y peróxido por minuto a pH 6,5 y 37°C) se disolvió en una solución tampón Tris 25 mM, pH 7,2 preparado a partir de Tris base y ajustando el pH con ácido clorhídrico diluido, obteniéndose una solución al 1% p / v de LOx..

Esta preparación (10 mg / ml) se mantuvo en heladera a 5°C, se observó que podía ser utilizada durante aproximadamente dos / tres meses; luego se ese tiempo las corrientes catalíticas observadas en los sensores disminuían notablemente.

Los patrones de lactato se prepararon a partir de una solución madre 50 mM de L-lactato, preparada en el momento, y se realizaron las diluciones necesarias en la solución tampón utilizada como carrier, para obtener los patrones necesarios.

La solución de glucosa oxidasa (GOx, EC 1.1.3.4) se preparó utilizando una solución concentrada de la enzima (250 mg / ml) proveniente de *Aspergillus niger* (gentileza de MediSense), y se diluyó con agua hasta una concentración de 1 mg / ml en agua destilada.

Los patrones de glucosa se prepararon a partir de una solución madre 100 mM de glucosa, preparada por lo menos 24 horas antes de utilizarla, con el objeto de permitir se alcance el equilibrio de los anómeros por mutarrotación.

La solución de peroxidasa (HRP) se preparó utilizando peroxidasa de rábano (horseradish) liofilizada (Boehringer Mannheim GmbH) grado II, 190 Unid / mg, se preparó una solución al 0,1 % en agua destilada.

Los patrones de peróxido de hidrógeno se prepararon en el momento a partir de una solución madre 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.2.2. Otras soluciones

La solución tampón empleada como carrier en el sistema FIA y en la mayoría de los experimentos en condiciones estacionarias contiene KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, pH = 7,0 y 0,1 Molar en KCl (electrolito soporte). De no mediar aclaración, la solución tampón tiene esta composición.

En los experimentos de efecto de la fuerza iónica se utilizaron concentraciones crecientes de KNO<sub>3</sub> en solución tampón de fosfatos 0,1 M, pH 7,0.

Se preparó leche a partir de leche en polvo descremada. Se pesaron 10 gramos de polvo y se llevó a 100 ml con agua destilada (según instrucciones del fabricante). La composición aproximada de esta leche reconstituida se observa en la tabla 3.1.

Se utilizó medio MRS modificado, de la siguiente composición por litro: triptona 10 g; extracto de carne 8 g; extracto de levadura 4 g;  $K_2HPO_4$  2 g; acetato de sodio 5 g;  $SO_4(NH_4)_2$  2 g; citrato de sodio 2 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,2 g;  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  50 mg; Tween 80 1,0 ml. Esta composición de MRS, sin fuente de carbono adicionada la denominaremos MRS basal.

### 3.3. Síntesis del polímero redox

Se ha utilizado un nuevo complejo de osmio <sup>1</sup> sintetizado en los laboratorios de electroquímica, con una estructura del tipo  $(Os(bpy)_2Cl(pyCHO))^+$  donde bpy es 2,2'-bipiridina y pyCHO es piridina-4-aldehído. Este complejo se une a polialilamina, obteniéndose un polímero cuya estructura molecular se esquematizó en la figura 1.2 (en Introducción) y denominaremos PAAOs.

Algunas características importantes del PAAOs son: elevada estabilidad en estados de oxidación II y III; y un potencial formal de reducción de 0,26 V vs ECS (a 25 °C en solución acuosa).

Su síntesis se realizó de la siguiente manera: polialilamina clorhidrato (Aldrich) se sometió a diálisis contra agua durante tres días utilizando una membrana de acetato de celulosa con capacidad para retener moléculas de peso molecular superior a 12000 (cut-off 12 KD); luego la solución de polímero fue liofilizada. 15 mg de polialilamina clorhidrato fueron disueltos en metanol anhidro por medio del agregado de 40  $\mu$ l de trietilamina. Se agitó la solución hasta disolución completa del polímero. Se adicionaron lentamente 22 mg de  $(Os(bpy)_2Cl(pyCHO))Cl$  sintetizada según se ha informado previamente <sup>2</sup> en solución metanólica. La mezcla obtenida fue agitada durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se la enfrió en baño de hielo. Se agregó (en exceso)  $NaBH_4$  y se continuó agitando durante 1 hora. El metanol se eliminó por evaporación y el residuo obtenido disuelto en agua. Esta solución de polímero fue purificada mediante diálisis durante tres días.

La concentración del complejo de Os fue evaluada mediante métodos espectrofotométricos, se asumió que la absorptividad del complejo de Os en el polímero es la misma que en  $(Os(bpy)_2Cl(pyCHO))^+$ . Mediciones de pH permitieron

obtener la relación entre grupos aminos libres y protonados <sup>2</sup>. Se estimó que la relación entre grupos amino : osmio es igual a 8:1.

### 3.4. Sistema de inyección en flujo

#### 3.4.1. Celdas utilizadas

Se utilizó una celda de flujo tipo Wall - Jet. La celda fue diseñada y construida en nuestro laboratorio. Está torneada en una pieza de acrílico transparente, y permite la conexión de un electrodo de referencia en su parte inferior, el electrodo de trabajo en la parte superior y el electrodo de medición es atornillado en la parte central, como se observa en la figura 3.1.

En este tipo de celda el carrier pasa a través de una tobera de 0,5 mm de diámetro e impacta sobre el electrodo de trabajo. Esta configuración permite aumentar la sensibilidad de la respuesta y evitar la formación de un gradiente de concentraciones en la proximidad de la superficie del electrodo de trabajo, donde el analito es consumido.

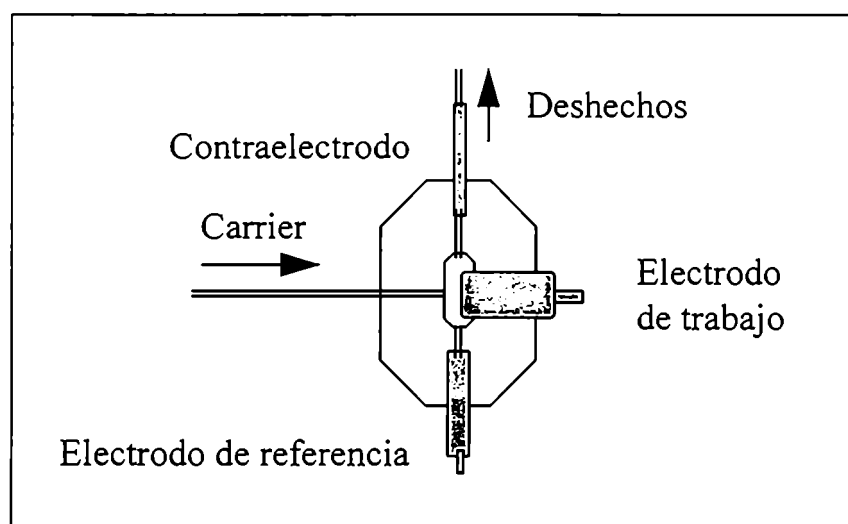


Figura 3.1. Representación esquemática de la celda de flujo empleada con electrodos enzimáticos.

En los trabajos realizados con células microbianas inmovilizadas en geles de alginato se utilizó una celda donde el flujo de carrier se comporta de una manera similar al de una columna de filtración en geles. Está construida utilizando un tubo de poliamida, con los conectores necesarios para la entrada y salida del carrier (figura

3.2). Antes de la entrada del carrier en la celda, pasa por un espiral (coil) de 40 cm (no se observa en la figura 3.2) que permite que la solución alcance la temperatura de trabajo antes de llegar a la celda. El volumen útil de la celda es de 3 ml, y se utilizaron en los ensayos 2 ml de cuentas de alginato de calcio.

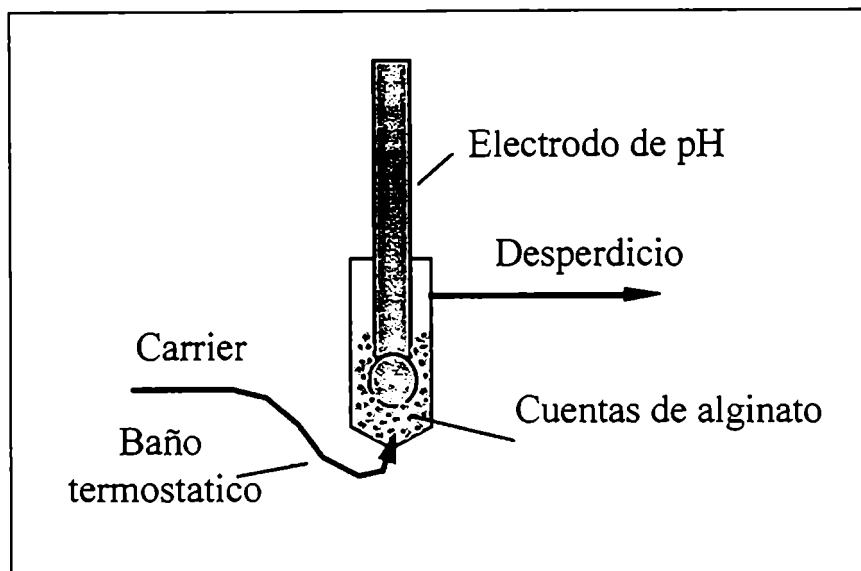


Figura 3.2. Representación esquemática de la celda de flujo utilizada con células inmovilizadas en cuentas de alginato de calcio.

#### 3.4.2. Otros elementos del sistema

Se utilizó una bomba peristáltica, cuya función es impulsar la solución carrier a través de los tubos que componen el sistema y de las celdas de flujo. Hemos empleado una bomba modelo Reglo (Ismatec) con capacidad para cuatro canales, que cuenta con 8 rodillos, lo que proporciona un flujo sumamente constante del carrier. Está diseñada para uso continuo, y posee velocidad regulable mediante un control analógico, con 100 velocidades discretas, entre 0,076 y 76 ml / min. También posee una interface analógica RS232, que permite que la bomba sea manejada mediante una PC e interfase adecuada.

Válvula inyectora. Se utilizó una válvula de inyección manual, de 6 canales y 2 posiciones, marca Reodyne, apta para sistemas de baja presión. Esta válvula permite inyectar en el flujo de carrier volúmenes bien definidos y constantes de muestra, de una manera reproducible. Se utilizaron loops que permitieron ensayar distintos volúmenes de inyección de muestra, de 70  $\mu\text{L}$ , 170  $\mu\text{L}$  y 570  $\mu\text{L}$ . Las conexiones



distintos volúmenes de inyección de muestra, de 70  $\mu\text{L}$ , 170  $\mu\text{L}$  y 570  $\mu\text{L}$ . Las conexiones utilizadas fueron en general de Peek, y las tubuladuras (de un diámetro interno de 1/16 de pulgada) de este mismo material o bien de Tygon.

### 3.5. Técnicas de inmovilización

#### 3.5.1. Entrecruzamiento con polialilamina / PEG

El método empleado se denomina fraguado directo, consiste en colocar en la superficie del electrodo los distintos componentes, típicamente una enzima, polietilenglicol (PEG 400) que actúa como entrecruzante entre la enzima y el polímero redox utilizado, PAAOs. Estos reactivos se mezclan en la superficie del electrodo, y se permite que avance la reacción de entrecruzado durante 24 horas, a 5°C en atmósfera húmeda. En el caso de los electrodos bienzimáticos construidos solo la primer capa sobre el electrodo se construye de esta manera. Para las capas que se construyen sobre la anterior, la mezcla de los componentes se realiza sobre vidrio de reloj, y luego se coloca un volumen adecuado de esta mezcla sobre el electrodo. Entre distintas capas se permitió el fraguado durante por lo menos 24 horas a 5 °C en atmósfera húmeda. En la figura 3.3 se observa la disposición de estas capas sobre el electrodo de trabajo en los electrodos bienzimáticos.

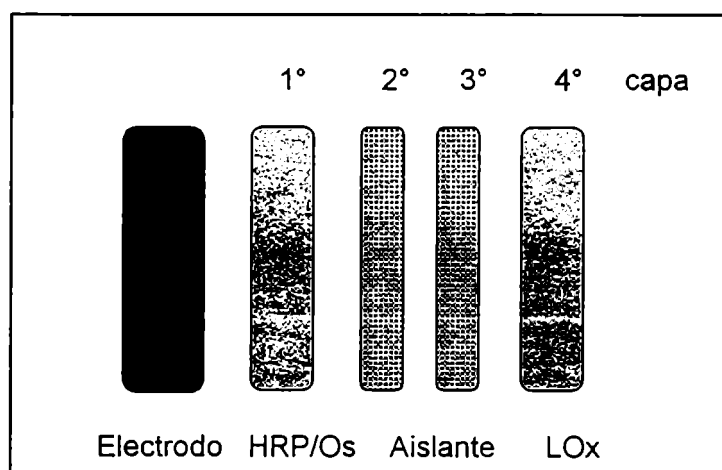


Figura 3.3. Disposición de las capas enzimáticas y aislantes sobre los electrodos de carbón vítreo. La composición precisa de estas capas en los electrodos construidos se encuentran en el tabla 3.2.

En algunos casos se construyeron electrodos sin entrecruzante, observándose que la interacción electrostática enzima-PAAOs y los procesos de adsorción de estos compuestos sobre el electrodo son importantes, obteniéndose biosensores enzimáticos operativos.

### **3.5.2. Alginato de calcio**

Se crecieron las células durante aproximadamente 24 horas en medio MRS basal con el agregado de la fuente de carbono elegida. Se cosecharon por centrifugación (2000 r.p.m., 15 minutos), y se resuspendieron en agua destilada. Se preparó 1 ml de solución de alginato de sodio en agua, al 2%, y se mezcló perfectamente con un mismo volumen del resuspendido de células, en agua. Esta mezcla se colocó dentro de una jeringa estéril de 10 ml, y se depositó por goteo sobre un baño gelificante, bajo constante y fuerte agitación.

El baño gelificante (volumen 1 litro) está formado por NaCl (0,2 M) y  $\text{CaCl}_2$  (0,05 M). Este procedimiento <sup>3</sup> permitió obtener cuentas (beads) de tamaño uniforme y forma redondeada.

Las cuentas permanecieron en el baño gelificante durante 10 minutos y fueron lavadas con agua destilada. Luego de esto se colocaron en medio MRS basal adicionado con la fuente de carbono correspondiente al medio de crecimiento. Se ubicaron en una estufa a 37 °C durante 4 horas, y se guardaron en heladera a 5°C.

### **3.5.3. Geles de agar-agar**

Se utilizó MRS-agar en concentraciones finales de 0,75 y 1,5% p / v. Estas concentraciones finales surgen de mezclar en partes iguales células resuspendidas en MRS basal, y MRS-agar a una temperatura de aproximadamente 50 °C. Rápidamente la suspensión resultante se distribuyó sobre cápsulas de Petri, obteniéndose una lamina de células en agar-agar.

### 3.6. Métodos microbiológicos

#### 3.6.1. Cepas de *Lactobacillus* utilizadas

Se utilizaron cepas tipo, provenientes de distintos ceparios (ATCC y CRL), y en algunos casos se utilizaron aislamientos realizados en nuestro laboratorio.

*Lactobacillus acidophilus*, cepa CRL 1014. Homofermentativa, la mayoría de las cepas producen DL-lactato. Acidificación y coagulación de la leche variable, entre 0,3 y 1,9 % de ácido láctico al final de la fermentación. Temperatura óptima de crecimiento 35-38 °C. Se han aislado del tracto intestinal de humanos y animales, así como también en boca y vagina humanas <sup>4</sup>.

*Lactobacillus casei*, ATCC 393. Heterofermentativa facultativa, la mayoría de las cepas producen un exceso de L-lactato (90 %) respecto a la forma D-. El máximo producido en medio de leche es de 3,6%. Se han aislado de quesos y leche, productos lácteos, tracto intestinal de humanos y animales, así como también en boca y vagina humanas.

*Lactobacillus plantarum*, ATCC 14917. Heterofermentativa facultativa, produce DL-lactato. Acidificación y coagulación de la leche variable, entre 0,3 y 1,2 % de ácido láctico al final de la fermentación. Temperatura óptima de crecimiento 30-35 °C. Se han aislado de productos lácteos, en plantas de fermentación, productos vegetales, tracto intestinal de humanos, boca y heces. No ha sido encontrada en boca y tracto intestinal de ratas, conejos y otros animales.

Cepa Y3, aislada de yoghurt comercial, posiblemente *Lactobacillus casei* por patrón de fermentación. Se seleccionó en primera instancia entre otros aislamientos de yogures por su elevada capacidad de acidificación y rápido crecimiento.

#### 3.6.2. Condiciones y medios de cultivo

Las cepas utilizadas fueron conservadas en heladera a 4°C en medio MRS basal adicionado con lactosa o en MRS conteniendo 15 % de glicerol a -70 °C. Las células se cultivaron en medio MRS basal con el agregado de glucosa, lactosa o maltosa como fuente de carbono, en una concentración de 2 % p / v, a 37 °C. El

agregado de distintas fuentes de carbono durante el cultivo de las células demostró tener efectos dramáticos en los ensayos. El inóculo para el cultivo utilizando glucosa o lactosa como fuente de carbono fue del 0,5 % v / v y de 1 % v / v respectivamente, debido a que el crecimiento resultó ser mas rápido en glucosa. Los cultivos se mantuvieron sin agitación ni aireación, durante 16-24 horas.

### **3.6.3. Medición de D.O. y conteo de células viables**

El crecimiento de las células se siguió mediante la medición de absorbancia a 550 nm. Los cultivos de 16-24 horas (volumen 35 ml), con una D.O. de entre 3 y 4 fueron centrifugados y usados en los ensayos con células libres o inmovilizadas. En alícuotas de 1 ml se midió peso húmedo y peso seco. Se siguió la viabilidad de las células mediante conteos en placa (ufc / ml), realizando diluciones seriadas en una solución 8,5 g / l de NaCl, distribuyendo 100 µl sobre placas de Petri conteniendo MRS-agar (1,5 % agar, Merck) antes de la inmovilización, en las distintas etapas de los ensayos y durante el almacenado en frío. Para el conteo de las células inmovilizadas, 3 cuentas se colocaron en 1 ml de una solución de EDTA al 2%, el EDTA secuestra los iones  $Ca^{++}$  del alginato de calcio, provocando su desestabilización rápidamente.

### **3.6.4. Método estándar para la caracterización de *Lactobacillus***

Se realizó utilizando un método previamente descrito <sup>5</sup>. Se colocaron en placas de 96 pozos 200 µl de medio MRS modificado (ADSA-MICRO, Barcelona, España), que carece de extracto de carne e incorpora 0,04 g / l de indicador de pH, rojo de clorofenol. Se agregó a los pozos hidratos de carbono, a una concentración final de 1 % p / v, y se inocularon con 10 µl de un cultivo de 16 horas, incubándose a 37 °C. Cambios en la coloración (rojo / amarillo) luego de un periodo de 24 horas se consideraron positivos, cambios de coloración luego de 3 días de incubación se consideró respuesta positiva tardía (delayed). Se consideraron negativos aquellos ensayos en los que no se observó cambio de coloración luego de 4 días. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. La nomenclatura utilizada es la siguiente: (+) positivo; (-) negativo; (d) respuesta positiva tardía (delayed).

### **3.7. Electrodo y protocolo utilizado en los ensayos de efecto del pH en las corrientes catalíticas**

Sobre electrodos de oro, de 3 mm. de diámetro, se construyeron hidrogeles enzimáticos con la siguiente composición, utilizando lactato oxidasa:

1,5 µl PAAOs (0,3% p/v) + 1,5 µl LOx (1% v/v) + 1,5 µl PEG 400 (0,1% v/v)

Expresado en masa, su composición es:

4,5 µg PAAOs + 15 µg LOx + 1,5 µg PEG 400

Electrodos basados en glucosa oxidasa, sobre el mismo material, se construyeron de la siguiente manera:

1,5 µl PAAOs (0,3% p/v) + 1,5 µl GOx (0,1% v/v) + 1,5 µl PEG 400 (0,1% v/v)

Su composición, expresada en masa es:

4,5 µg PAAOs + 1,5 µg GOx + 1,5 µg PEG 400

Se realizaron mediciones en solución tampón fosfatos 50 mM, pH 7,0, 100 mM en KCl, 5 mM en glucosa para los ensayos con electrodos GOx y 2,5 mM en L-lactato en los ensayos con electrodos LOx. Se agregó HCl 2 M o NaOH 2M para obtener, por titulación, los distintos pHs.

Las mediciones se realizaron en el sistema FIA, en celda wall-jet, velocidad de flujo del carrier de 1,5 ml/min. Temperatura ambiente, aproximadamente 25 °C. El electrodo de trabajo se polarizó a 400 mV versus ECS.

El protocolo utilizado fue el siguiente:

- A. Se coloca el electrodos en el sistema de flujo y se espera 10 minutos o hasta que su corriente se estabilice, utilizando como carrier solución tampón pH = 7,0 + KCl
- B. Se apaga la bomba peristáltica y se coloca como carrier solución tampón + KCl + glucosa, pH 7,0. Se enciende la bomba, y se mide la corriente a los 90 segundos (el carrier, considerando diámetro y longitud de las tubuladuras llega a la celda en aproximadamente en 40 segundos)

C. Se apaga la bomba, se titula el carrier (solución tampón + KCl + glucosa) para llevarlo al pH deseado. Se enciende la bomba, y se mide corriente a los 90 segundos.

D. Se repite el punto C. para cada valor de pH deseado.

E. Se llega a el valor de pH en el cual la corriente catalítica es mínima o despreciable, se ensaya la recuperación del electrodo a pH 7,0.

F. Se utilizaron electrodos distintos (gemelos) para estudiar el efecto de los pHs alcalinos o ácidos, ya que la prueba es generalmente destructiva.

Se normalizaron los datos de un electrodo respecto al otro, considerando la señal inicial a pH 7,0 de ambos electrodos.

### **3.8. Electrodos y protocolo utilizado en los ensayos de efecto de la temperatura en las corrientes catalíticas**

Se utilizaron electrodos LOx y GOx de idéntica composición a la informada en el capítulo 3.7.

Se realizaron mediciones en tampón fosfatos 50 mM, pH 7,0 100 mM en KCl, 2,5 mM en L-lactato para los ensayos con electrodos LOx; en los ensayos con electrodos GOx se utilizó tampón fosfatos 50 mM, pH 7,0 100 mM en KCl, 5 mM en glucosa. Se agregó HCl 2 M o NaOH 2M para obtener, por titulación, los distintos pHs.

Se utilizó una en celda electroquímica con camisa de agua, sobre agitador magnético. El volumen de la celda electroquímica fue de 20 ml y la agitación de aproximadamente 500 rpm. Se comenzó la experiencia a 5°C, y se aumentó la temperatura (rampa de 2 °C / min) hasta que la señal entregada por el electrodo fue mínima.

### **3.9. Separación de los componentes de la leche y protocolos utilizados para ensayar su efecto en los biosensores enzimáticos**

#### **3.9.1. Por peso molecular**

Utilizando una membrana de diálisis de corte molecular de 12000 Daltons se dializó leche descremada en polvo (su composición se observa en la tabla 3.1) durante 48 horas a 5 °C contra solución tampón de fosfatos 7,5 mM, pH 7,0. Los ensayos se realizaron utilizando la fracción de alto peso molecular, diluyéndola 1:1 utilizando tampón fosfatos 100 mM pH 7,0 200 mM en KCl.

Componentes mayoritarios de la leche descremada (valores medios) en g cada 100 g		
Lactosa		4,7
Proteínas	Caseínas	2,7
	Lactalbúmina	0,4
	Albúminas + Globulinas	0,15
Comp. nitrogenados no proteicos		0,2
Sales mayoritarias	K <sub>2</sub> O	0,15
	Na <sub>2</sub> O	0,07
	CaO	0,13
	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,11
Materia grasa		0,1

Tabla 3.1. Componentes mayoritarios de la leche <sup>6</sup> reconstituida a partir de leche en polvo 10 % p / v.

### 3.9.2. Precipitación ácida

Se acidificó leche reconstituida descremada con ácido HCl 1 M hasta pH = 4,6. Se centrifugó a 20,000 r.p.m. 15 minutos hasta separar el precipitado. Se separó el precipitado del sobrenadante y se llevó a volumen con tampón pH = 7,0 ambas fracciones. El precipitado se denomina caseína isoelectrica , y el sobrenadante es conocido en la industria láctica como suero de la leche o suero lácteo y las proteínas que lo componen son principalmente lactoalbúminas y globulinas <sup>7</sup>. El precipitado obtenido se redisuelve mayoritariamente en solución tampón a pH 7,0.

### 3.9.3. Protocolo utilizado para ensayar el efecto de las fracciones sobre los electrodos.

El protocolo utilizado para cuantificar el efecto del dializado y de otros compuestos que se ensayaran más adelante fue el siguiente:

1) Se realizan voltametrías cíclicas en tampón entre 0 y 550 mV a una velocidad de barrido de 10 mV / seg, en ausencia y presencia sustrato (para electrodos LOx, L-lactato 2,5 mM; para electrodos GOx, glucosa 5 mM) en estacionarias sin agitación.

Se mide la variación de corriente entre ambos voltamogramas a +400 mV vs ECS. Estos valores de corriente son tabulados.

2) En las mismas condiciones se coloca en electrodo en la solución a ser ensayada, en este caso dializado, y se realizan voltametrías cíclicas sin y con agregado de sustrato. A este paso le hemos llamado "tratamiento". Se mide la variación de corriente entre ambos voltamogramas a +400 mV vs ECS.

3) Se coloca el electrodo nuevamente en tampón, y se ensaya la posible pérdida de corriente catalítica. Se mide la variación de corriente entre ambos voltamogramas a +400 mV vs ECS.

### 3.10. Composición de los electrodos bienzimáticos bicapa diseñados

Se construyeron distintos tipos de biosensores enzimáticos, sobre electrodos de carbón vítreo de 5,5 mm de diámetro, cuya composición puede observarse en la tabla 3.2. Luego que los componentes de cada capa fueron adicionados, los electrodos permanecieron durante 20 - 24 horas a 4° C en atmósfera húmeda.

Composición	Bienzimático 1	Bienzimático 2	Bienzimático 3	Bienzimático 4
1° capa	15 µg PAAOs	15 µg PAAOs	15 µg PAAOs	15 µg PAAOs
	2 µg HRP	2 µg HRP	2 µg HRP	3 µg HRP
	60 µg PEG	60 µg PEG	60 µg PEG	50 µg PEG
2° capa	18 µg PAA	18 µg PAA	18 µg PAA	18 µg PAA
	60 µg PEG	60 µg PEG	60 µg PEG	60 µg PEG
3° capa	18 µg PAA	18 µg PAA	18 µg PAA	150 µg LOx
	60 µg PEG	60 µg PEG	60 µg PEG	
4° capa	680 µg BSA	68 µg BSA	10 µg PAA	15 µg PAA
	40 µg LOx	40 µg LOx	33 µg LOx	50 µg LOx
	50 µg Glu.	0,5 µg Glu.	17 µg PEG	5 µg PEG

Tabla 3.2. Composición de los diferentes electrodos bienzimáticos bicapa construidos. Glu. es glutaraldehído.



### **3.11. Equipamiento electrónico y sistema de adquisición de datos**

Se utilizó un potencióstato modular con generador de rampa triangular y sistema de filtrado de señal, un registrador-plotter X/T - X/Y HP7090A de tres canales con conversores A/D de 12 bits para los ensayos cronoamperométricos.

Los ensayos utilizando técnicas de voltametría cíclica se realizaron con un potencióstato construido en el laboratorio de electroquímica, interfaseado a una computadora PC-XT utilizada como registrador o bien un bipotencióstato Pine modelo AFRDES interfaseado con una computadora PC-Pentium. Se diseñaron instrumentos virtuales utilizando el programa LabView que permitieron la adquisición, procesamiento de datos e inclusive controlar la bomba peristáltica utilizando un conector RS232.

Se utilizó también un pH-metro digital con salida analógica para registrador Schott CG 837

### 3.12. Referencias

1. Danilowicz C.; Cortón E.; Battaglini F.; *J. Electroanal. Chem.* **446** (1998) 89.
2. Yoshikawa Y.; Matsouka H.; Ise N.; *Br. Polym. J.* **18** (1986) 242.
3. Øyaas J.; Storro I.; Levine D.W.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46** (1996) 240.
4. Kandler O.; Weiss N.; Regular, Nonsporing Gram-Positive Rods. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 2*. Holt J.G. Editor, section 13. Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1986.
5. Veyrat A.; Monedero V.; Perez-Martinez G.; *Microbiology* **140** (1994) 1141.
6. Fundamentals of Dairy Chemistry. Wong N.P. Editor. Van Nostrand Reinhold, New York, 1988.
7. Ciencia de la Leche, Alais C. Editor, Reverte, Barcelona, 1985.

## 4. RESULTADOS OBTENIDOS CON ELECTRODOS BASADOS EN GLUCOSA OXIDASA

### 4.1. Introducción

En este capítulo se caracteriza el PAAOs como mediador redox para la oxidación. Se elige como sistema modelo Glucosa Oxidasa (GOx) por su estabilidad en diferentes condiciones (pH, temperatura, fuerza iónica), de manera de poder juzgar fehacientemente la capacidad del polímero como mediador.

Como entrecruzante entre el polímero y la enzima se eligió polietilenglicol diglicidil éter (PEG), por sus características hidrofílicas; es un entrecruzante adecuado para este tipo de geles y ha sido probado exitosamente en otros sistemas <sup>1-2</sup>.

El PAAOs se mezcla con la enzima y con el PEG para obtener un gel redox (sección 3.4.), como puede observarse en la figura 4.1.

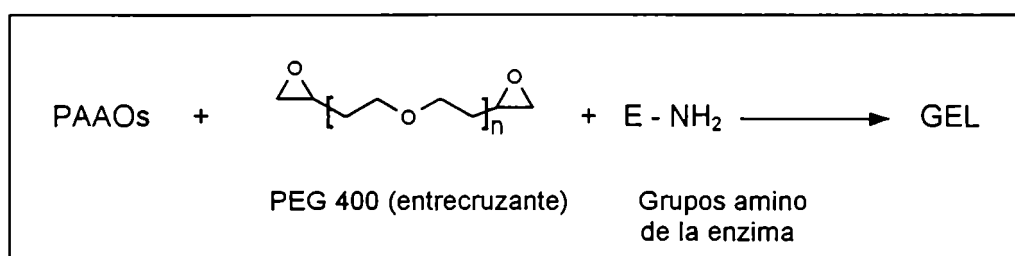


Figura 4.1. El polietilendiglicidileter, una mezcla con un peso molecular promedio de 400 (PEG 400) entrecruza la enzima y el PAAOs obteniéndose un gel redox estable.

En presencia de glucosa, la enzima contenida en el gel se reduce, los electrones ganados por esta se transfieren inmediatamente al PAAOs y de este a la superficie del electrodo de trabajo, produciendo una corriente mensurable. Esta corriente es proporcional a la concentración de glucosa en el medio, en cierto ámbito de concentraciones.

La figura 4.2 resume la cadena de eventos que culminan en la producción de corriente en la superficie del electrodo de trabajo.

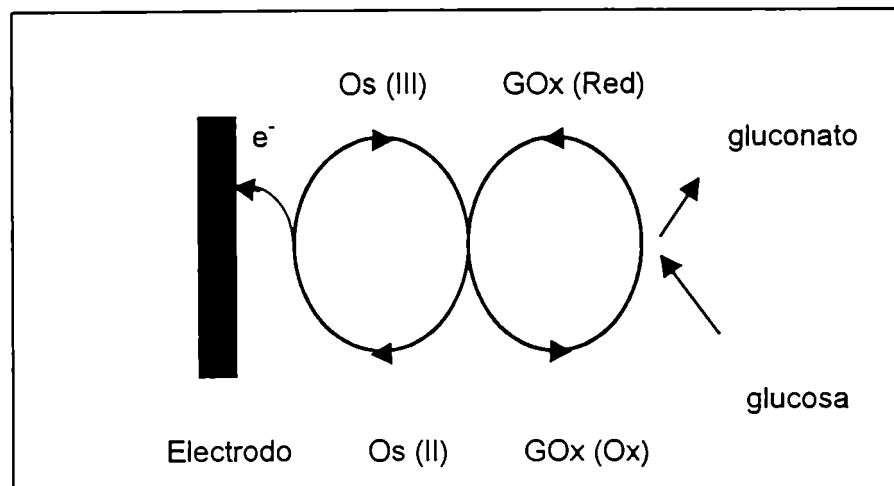


Figura 4.2. Transferencia de masa y carga en un electrodo monoenzimático, en presencia de glucosa. Os ( ) representa los centros redox del polímero, y su estado de oxidación.

#### 4.2. Pruebas preliminares en celda electroquímica.

Durante los primeros estudios de este sistema (hasta la sección 4.4.3.) se utilizaron electrodos de carbón vítreo de 5,5 mm de diámetro, mientras que en las restantes secciones se utilizaron electrodos de oro de 3 mm de diámetro.

La cantidad de PAAOs y GOx depositada por unidad de superficie en todos los casos es la misma,  $63 \mu\text{g} / \text{cm}^2$  y  $21 \mu\text{g} / \text{cm}^2$  respectivamente.

En la sección 4.2 y 4.3 se caracteriza un electrodo de carbón vítreo modificado con la siguiente composición:

5 $\mu\text{l}$ PAAOs (0,3%)	= 15 $\mu\text{g}$
5 $\mu\text{l}$ GOx (0,4%)	= 5 $\mu\text{g}$
4 $\mu\text{l}$ PEG (1%)	= 40 $\mu\text{g}$

Ensayos típicos se observan en la figura 4.3. Se realizaron voltametrías cíclicas en solución tampón y en solución tampón 10 mM en glucosa. Los resultados obtenidos demuestran que las voltametrías cíclicas se modifican por el agregado de

glucosa, y que la variación de corriente (entre ambas voltametrías) a 400 mV vs. ECS es importante, del orden de los 20,5  $\mu\text{A}$ .

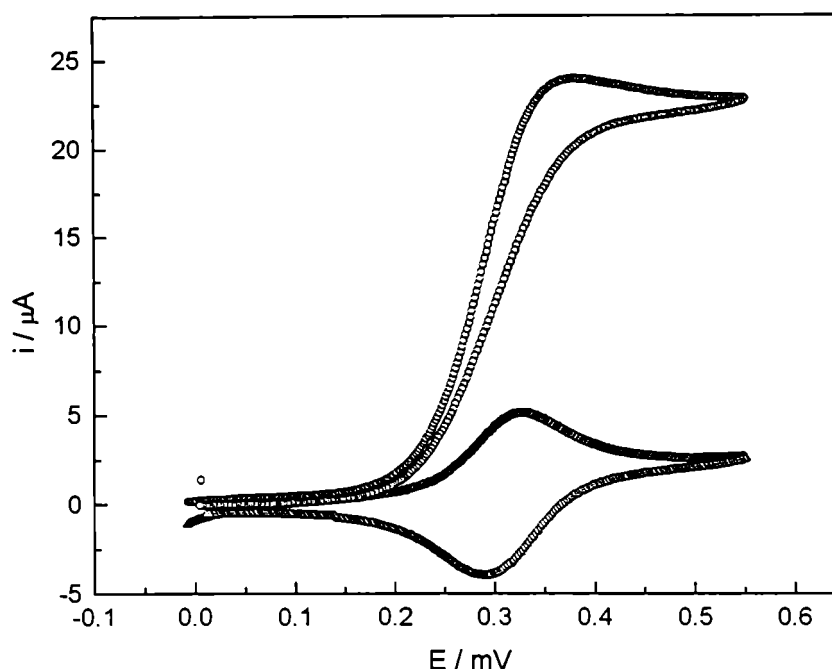


Figura 4.3. Electrodo GOx sobre carbón vítreo.  $V = 2\text{mV} / \text{seg.}$ , en tampón (círculos) y en tampón + glucosa 10 mM (triángulos).

#### 4.3. Estudios de reproducibilidad y rango de linealidad en el sistema FIA.

Se utilizó una celda de tipo wall-jet, descrita en materiales y métodos. Como electrodo de referencia se utilizó ECS. El carrier fue solución tampón fosfatos 50 mM,  $\text{pH} = 7,0$  y 0,1 molar en KCl. El loop de inyección tiene un volumen de 70  $\mu\text{L}$  y la velocidad de flujo fue de 1,5 ml / min; estas fueron las condiciones óptimas para el sistema FIA, luego de ensayar loops de 70, 170 y 570  $\mu\text{L}$  y velocidades de flujo entre 0,4 y 5 ml / min. Los ensayos se realizaron inyectando patrones de glucosa preparados en solución carrier. La figura 4.4 muestra los resultados obtenidos en una calibración típica.

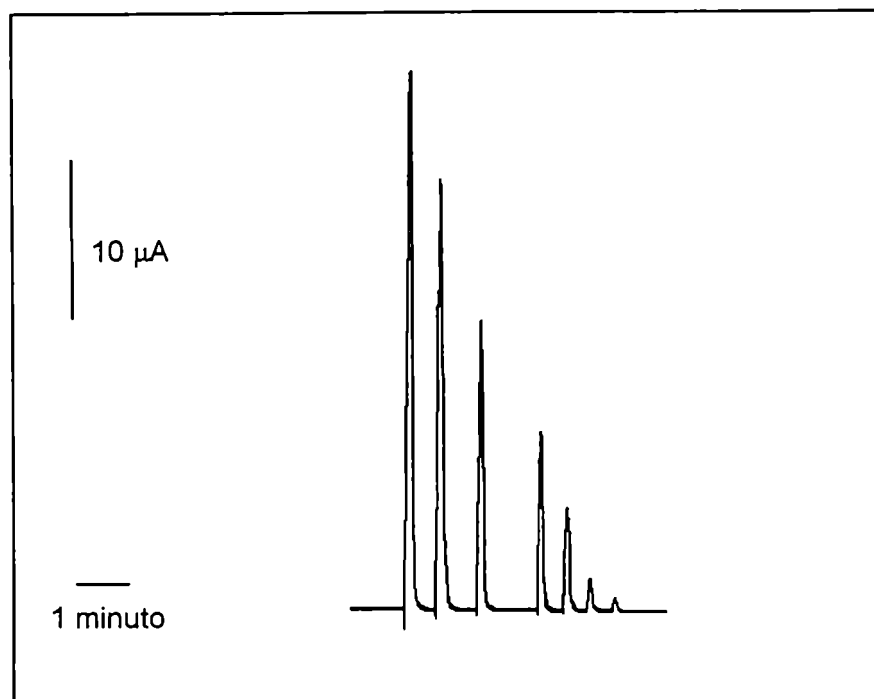


Figura 4.4. Patrones de glucosa en el sistema FIA. De izquierda a derecha, 100; 50; 20; 10; 5; 2,5 y 1,25 mM.

Se realizaron las curvas de calibración correspondientes, que muestran que el sistema responde linealmente hasta 10 / 20 mM de glucosa, con un límite de detección de aproximadamente 0,5 / 1 mM. Los coeficientes de correlación en estos ámbitos de concentración son típicamente  $r^2 = 0,99 / 0,98$ .

Para la curva de calibración de la figura 4.4 (modelo lineal,  $y = A + B \cdot x$ ) los parámetros obtenidos (rango 0 - 10 mM) son los siguientes;  $A (\mu A) = -0,46$ ;  $B (\mu A / mM) = 1,36$ ;  $r^2 = 0,984$ .

En la figura 4.5 se observa un ensayo de reproducibilidad. Luego de restar la línea de base para cada pico, correspondiente a una inyección de glucosa 10 mM, el análisis reportó los siguientes resultados:  $n = 10$ ,  $\bar{x} = 12,71 \mu A$ ,  $\sigma(n-1) = 0,08$  es decir, una desviación standard porcentual menor que el 1%

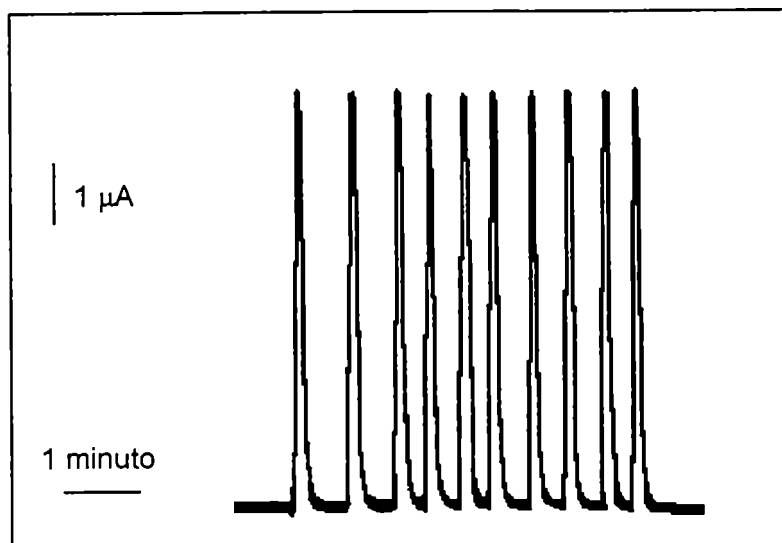


Figura 4.5. Reproducibilidad en el sistema FIA, ensayado inyectado 10 patrones consecutivos de glucosa 10 mM en solución tampón.

#### 4.4. Efecto del entrecruzante polietilendiglicidileter

El efecto del entrecruzante se estudia en dos etapas. Primero se usa una relación PEG:PAAOs de 0 a 6 (secciones 4.4.1 a 4.4.4). Se observa que altas concentraciones de entrecruzante disminuyen severamente la propagación de carga. Posteriormente, sección 4.4.5, se estudia en mayor detalle la relación PEG:PAAOs 0 a 0,66.

##### 4.4.1. Efecto de distintas concentraciones de PEG en las corrientes catalíticas y curvas de calibración.

Se prepararon, sobre electrodos de carbono vítreo, membranas enzimáticas con la siguiente composición:

5 μl PAAOs (0,3%)	= 15 μg
5 μl GOx (0,1%)	= 5 μg
X μl PEG (1%)	= X μg

La cantidad de PEG en los electrodos fue la variable, con valores entre 0 y 9  $\mu\text{l}$ , equivalente a 0 - 90  $\mu\text{g}$  respectivamente. Se ensayaron en el sistema FIA, con el electrodo de trabajo polarizado a +400 mV vs. ECS. Se midieron las corrientes catalíticas inyectando patrones 10 mM de glucosa. En la figura 4.6 puede observarse que la corriente catalítica inicial de estos electrodos disminuye al aumentar la concentración de PEG, desde valores máximos de 19,7  $\mu\text{A}$  en los electrodos sin PEG, en los que solo la interacción electrostática entre la PAAOs y GOx estabiliza el biosensor enzimático, hasta 6,3  $\mu\text{A}$  en los electrodos con carga máxima de PEG (90  $\mu\text{g}$  / electrodo; expresado en porcentaje el PEG es el 82 % de la masa colocada sobre el electrodo).

Esta disminución de la corriente catalítica puede ser atribuible a:

- Efecto aislante del PEG, dado que el entrecruzante diluye las concentraciones de las otras dos especies (PAAOs y GOx) aumentando la distancia entre los centros de Os y las enzimas <sup>1</sup>.
- Pérdida de actividad de las enzimas, por reacción de los grupos reactivos del PEG con alguna zona vital de la enzima, como residuos importantes en su sitio activo.
- Aumento del espesor del gel, dificultando la difusión del analito <sup>3</sup>.

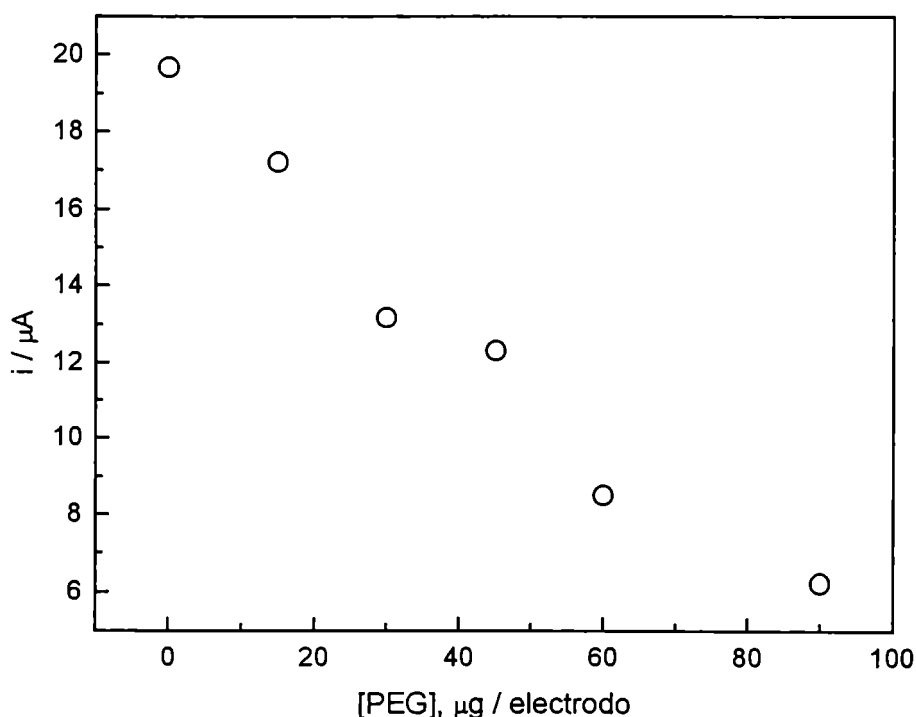


Figura 4.6. Efecto de la concentración de PEG en las corrientes catalíticas, PAAOs y GOx constante, 15 y 5  $\mu\text{g}$  respectivamente sobre el electrodo. Patrones 10 mM de glucosa.



La variación de las corrientes catalíticas al modificar la concentración de glucosa en los distintos electrodos se observa en la figura 4.7; se construyeron curvas de calibración en los rangos lineales; los parámetros de estas curvas de calibración se encuentran resumidos en la tabla 4.1. Se observa que la sensibilidad disminuye a medida que aumenta la concentración de PEG

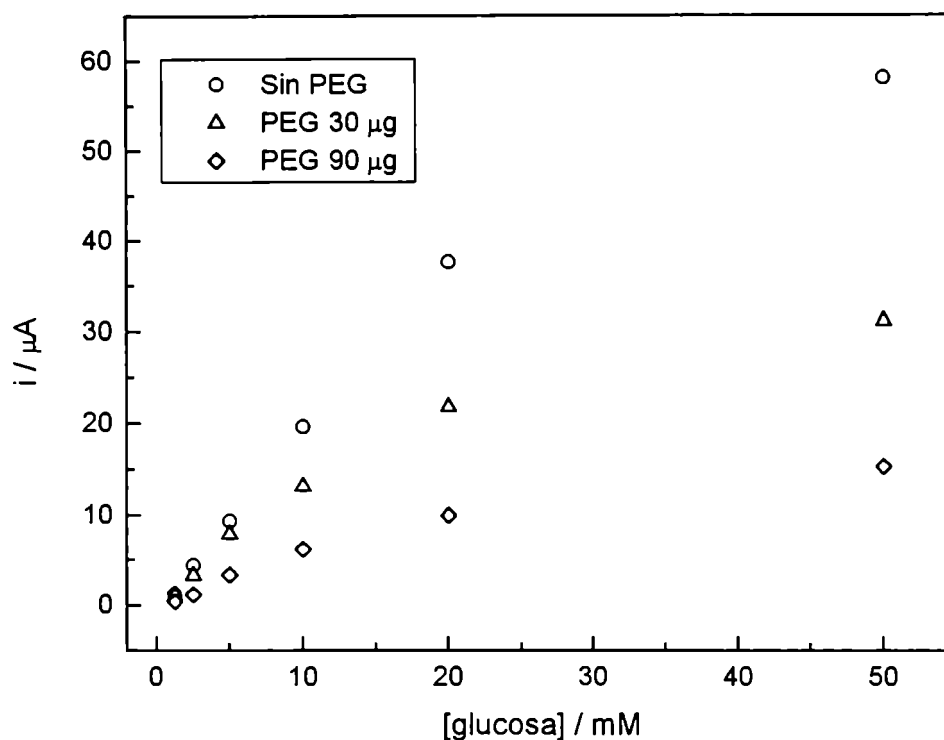


Figura 4.7. Efecto de la concentración de PEG en la respuesta de electrodo a distintas concentraciones de glucosa.

[PEG], $\mu\text{g}$	PEG:Os	A ( $\mu\text{A}$ )	B ( $\mu\text{A} / \text{mM}$ )	r
0	0	-0,482	1,929	0,999
15	1	-0,398	1,480	0,987
30	2	1,179	1,075	0,988
45	3	-0,374	1,002	0,996
60	4	-0,303	0,648	0,993
90	6	0,338	0,506	0,987

Tabla 4.1. Resumen de los datos de las calibraciones realizadas en el sistema FIA. Modelo lineal,  $y = A + B \cdot x$ , en el rango 0 - 20 mM de glucosa en todos los casos.

#### 4.4.2. Reproducibilidad.

Se realizaron inyecciones de 10 patrones (glucosa, 10 mM) en forma consecutiva. Los errores respecto a la media son típicamente del 2 %. No se observaron diferencias significativas entre los electrodos con distintas concentraciones de PEG (tabla 4.2.), aunque los electrodos con elevada concentración de PEG muestran una línea de base algo más ruidosa, que aumenta la incertidumbre de las mediciones.

[PEG], $\mu\text{g}$	$\bar{x}$ ( $\mu\text{A}$ )	$\sigma$ (n-1)
0	19,65	0,37
15	17,20	0,29
30	13,07	0,29
45	12,27	0,25
60	8,56	0,19
90	6,29	0,20

Tabla 4.2. Reproducibilidad, se realizaron inyecciones de patrones, glucosa 10 mM, n = 10.

#### 4.4.3. Velocidad de respuesta.

Se midió el tiempo necesario para alcanzar el 100% de la señal al inyectar patrones 10 mM de glucosa (Tr 100%) , así como aquellos necesarios para que el sistema retorne a la línea de base (ancho de pico, Wt). Los tiempos típicos pueden observarse en la tabla 4.3. El aumento de los tiempos de medición como consecuencia del aumento de la concentración de PEG puede deberse a cambios en la permeabilidad (difusión y transporte de masa) en los distintos hidrogeles. Las membranas con mayor concentración de PEG son de mayor espesor y la estructura del hidrogel es mas compacta, retrasando el transporte de la glucosa hasta los sitios catalíticos de las enzima, por lo que los tiempos necesarios para obtener el máximo de actividad catalítica y agotar la glucosa que ha logrado difundir en el gel se encuentran aumentados <sup>4</sup>.

[PEG], $\mu\text{g}$	Tr 100% (seg)	Wt (seg)
0	3.2	17.6
15	3.5	26.3
30	4.7	47.9
45	5.6	52.3
60	5.8	59.3
90	8.3	62.5

Tabla 4.3. Efecto del PEG en la velocidad de respuesta del sistema FIA. Tr 100 % se define como el tiempo necesario para que la señal transitoria alcance su máximo valor (tiempo de crecimiento); Wt se define en la sección 2.3.1

En la figura 4.8 se han calculado en número de muestras que pueden ser medidos, por unidad de tiempo, teniendo en cuenta los tiempos de respuesta de la tabla 4.3 y no permitiendo solapamiento de picos.

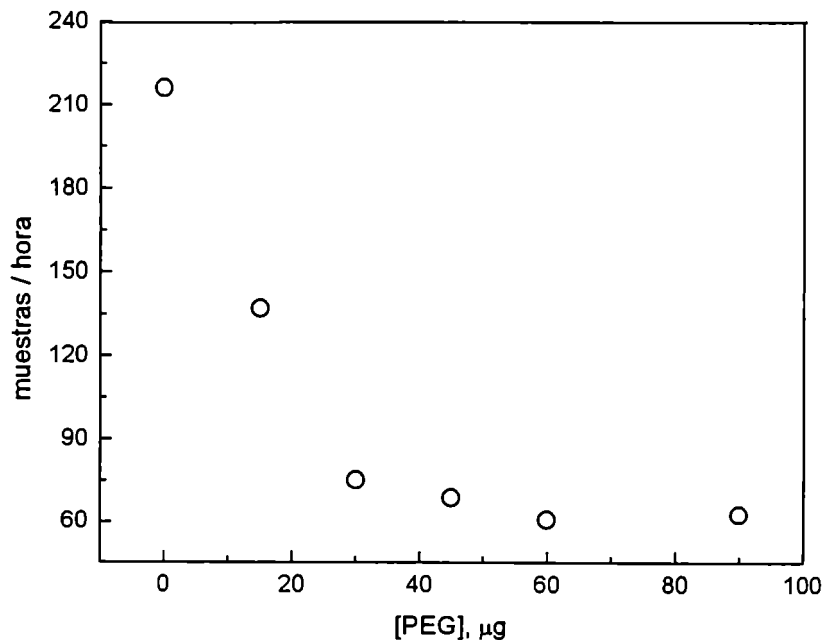


Figura 4.8. Efecto de la concentración de PEG en la capacidad de procesamiento de muestras por unidad de tiempo.

#### 4.4.4. Ensayos de estabilidad en el sistema FIA.

Se siguió la evolución de la señal en el tiempo mediante varios parámetros; se inyectaron patrones de glucosa 10 mM aproximadamente cada 10 minutos, y se calculó la pendiente utilizando regresión lineal. Los resultados obtenidos indican que la concentración de PEG esta relacionada en forma directa con la estabilidad y en forma inversa con las corrientes catalíticas obtenidas, como puede observarse en la figura 4.9. El PEG en bajas concentraciones es útil para retener el polímero en la superficie del electrodo, permitiendo que soporte durante más tiempo la acción desestabilizante del chorro de carrier que golpea perpendicularmente la superficie del electrodo en la celda wall-jet. En concentraciones más elevadas, cercanas a la relación  $\text{PEG} / \text{PAAOs} = 1$ , el efecto aislante del PEG es pronunciado, como puede observarse en la figura 4.10. Esta tendencia fue confirmada por los valores de corrientes iniciales y pendientes de caída de señal en los electrodos con concentraciones intermedias de PEG. Las pendientes calculadas para los graficos A y B (figura 4.9) son  $-1,97 \mu\text{A} / \text{h}$  y  $-0,17 \mu\text{A} / \text{h}$ , respectivamente.

Se realizaron voltametrías cíclicas antes y después de la permanencia de los electrodos en sistema FIA. Estos experimentos se realizaron sobre electrodos de oro de 3 mm de diámetro, colocando en estos un volumen total de  $4,5 \mu\text{l}$ , respetando las proporciones de enzima, PAAOs y PEG que en los experimentos anteriores. Estas voltametrías ( $V = 2 \text{ mV} / \text{seg}$ ) mostraron que en electrodos sin PEG parte importante de la carga (aproximadamente el 40 %) se pierde por lavado durante 2:30 Hs en la celda wall-jet. Al aumentar la cantidad de PEG, la carga sobre el electrodo se mantiene prácticamente constante.

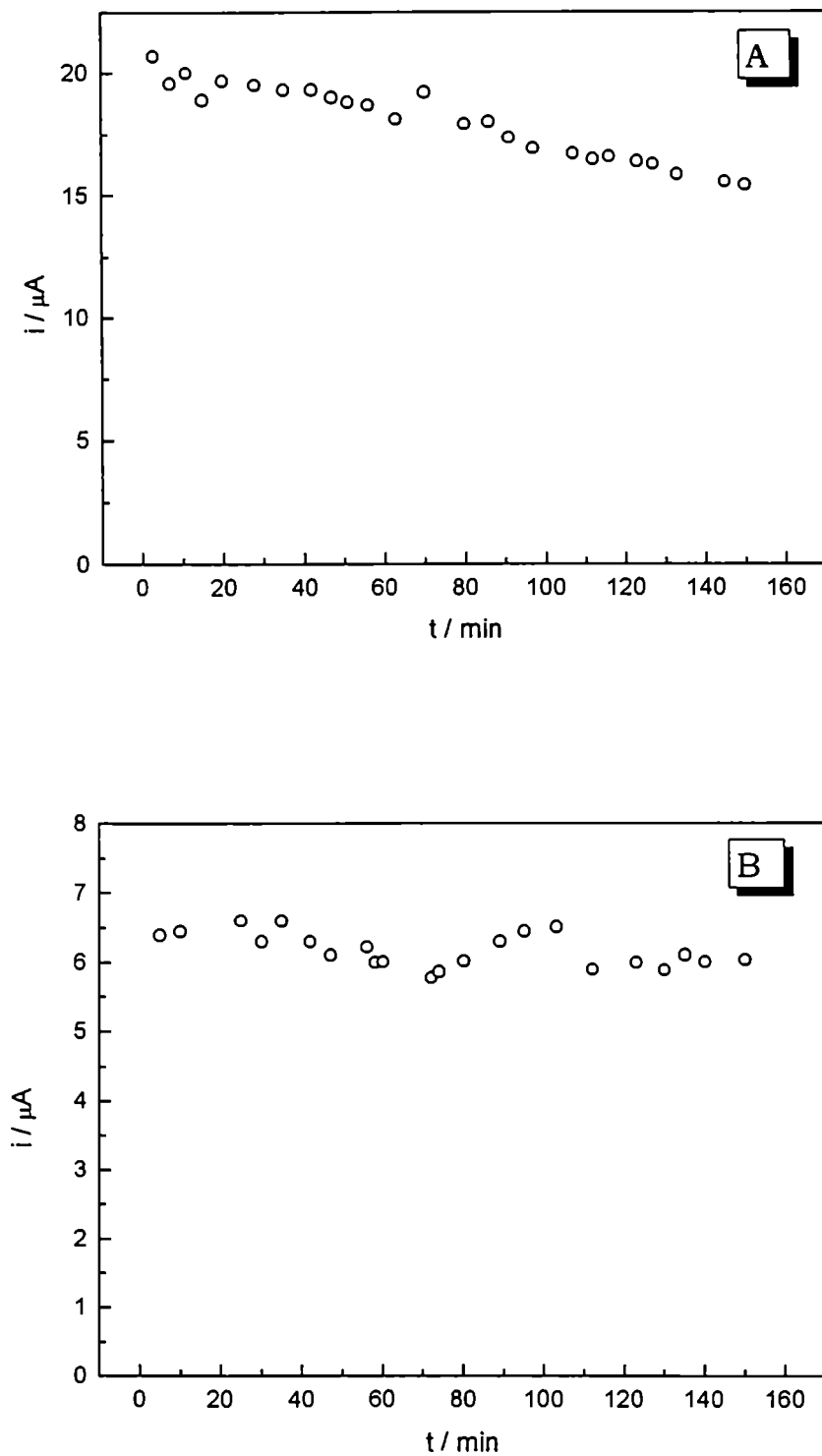


Figura 4.9. Estabilidad de los electrodos en el sistema FIA, celda wall-jet. Se siguió la respuesta a patrones de glucosa 10 mM. **A**, sin PEG; la pendiente es de  $2 \mu\text{A} / \text{h}$ . **B**,  $60 \mu\text{g}$  PEG; la pendiente es de  $0,17 \mu\text{A} / \text{h}$ . El carrier utilizado es solución tampón fosfatos 50 mM  $\text{pH} = 7,0$ ; 100 mM en KCl.

El comportamiento de electrodos de oro modificados enzimáticamente fue similar a lo registrado con electrodos de carbón vítreo. Además, los resultados obtenidos con electrodos de oro confirmaron los expresados en los puntos 4.4.1 al 4.4.4 inclusive.

#### 4.4.5. Efecto del entrecruzante en la transferencia de carga en los electrodos.

Distintas combinaciones de PAAOs, GOx y PEG fueron preparadas sobre electrodos de oro de 3 mm de diámetro, con mayor énfasis en electrodos conteniendo una relación PEG / PAAOs menor que 1, cuyas composiciones se observan en la tabla 4.4.

PAAOs	GOx	PEG 400	Relación PEG / PAAOs
4,5 µg	1,5 µg	18µg (A)	4
4,5 µg	1,5 µg	9µg (A)	2
4,5 µg	1,5 µg	3µg (B)	0,66
4,5 µg	1,5 µg	1,5µg (B)	0,33
4,5 µg	1,5 µg	0,5µg (B)	0,11
4,5 µg	1,5 µg	0,1µg (C)	0,022
4,5 µg	1,5 µg	0 µg	0

Tabla 4.4. Composición de los electrodos. PAAOs, solución 0,3 % p/v. GOx, solución 0,1 % v / v. PEG, solución A: 1 % v / v, B : 0,1 % v / v, C : 0,01 % v / v

Se realizaron voltametrías cíclicas "in situ", es decir, con los electrodos en la celda wall-jet y a una velocidad de flujo de carrier de 1,5 ml / min. El carrier utilizado fue solución tampón fosfatos pH 7,00 0,05 M; 0,1 M en KCl. Se realizaron voltametrías cíclicas a distintas velocidades de barrido, entre 2 y 50 mV / seg.

Relación PEG / PAAOs	Carga (Coul)	$\Delta E(I_{pa}-I_{pc})$ V = 20mV/seg
4	$3,95 \cdot 10^{-5}$	63,73
2	$5,08 \cdot 10^{-5}$	34,20
0,66	$6,64 \cdot 10^{-5}$	19,27
0,33	$9,53 \cdot 10^{-5}$	20,20
0,11	$9,02 \cdot 10^{-5}$	12,43
0,022	$8,66 \cdot 10^{-5}$	13,90
0	$5,95 \cdot 10^{-5}$	9,33

Tabla 4.5. Efecto del PEG sobre la carga y la separación de los picos anódico y catódico.

En la tabla 4.5 se observa que aún en una baja relación (0,33) el PEG produce un efecto aislante sobre los centros redox, ya que la diferencia de potenciales de pico es prácticamente el doble que en los electrodos que no contienen PEG. De todas maneras en la relación 0,33 se observa un máximo de corriente pico (figura 4.10). Esto se debe a un compromiso entre el efecto aislante del PEG y su capacidad de retener covalentemente centros redox.

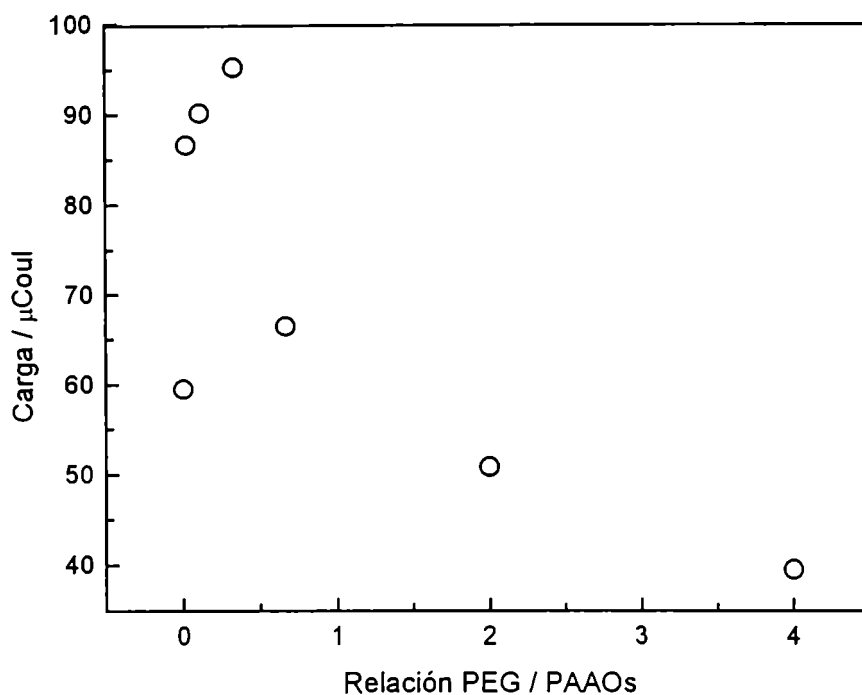


Figura 4.10. Propagación de carga sobre electrodos modificados con geles redox con distinta relación PEG / PAAOs.

#### 4.4.6. Efecto de soluciones de distinta fuerza iónica sobre la velocidad de transferencia electrónica.

Una serie de electrodos con la misma composición que los representados en la tabla 4.4 fueron ensayados en el sistema de flujo. Se utilizaron soluciones de tampón fosfatos pH 7,0 a las que se les agregó suficiente cantidad de nitrato de potasio, y / o glucosa, como puede verse en la tabla 4.6.



Solución	Tampón fosfatos	KNO <sub>3</sub>	Glucosa
<u>1</u>	0,05M pH 7,0	100 mM	-----
<u>2</u>	0,05M pH 7,0	100 mM	10 mM
<u>3</u>	0,05M pH 7,0	500 mM	-----
<u>4</u>	0,05M pH 7,0	500 mM	10 mM
<u>5</u>	0,05M pH 7,0	1000 mM	-----
<u>6</u>	0,05M pH 7,0	1000 mM	10 mM

Tabla 4.6. Soluciones utilizadas en los experimentos de fuerza iónica.

El protocolo empleado en los ensayos fue el siguiente: se lavó el electrodo durante 5 minutos en la solución correspondiente y luego se realizaron voltametrías cíclicas ( $V = 2 \text{ mV / seg}$ , flujo carrier  $1,5 \text{ ml / min}$ ).

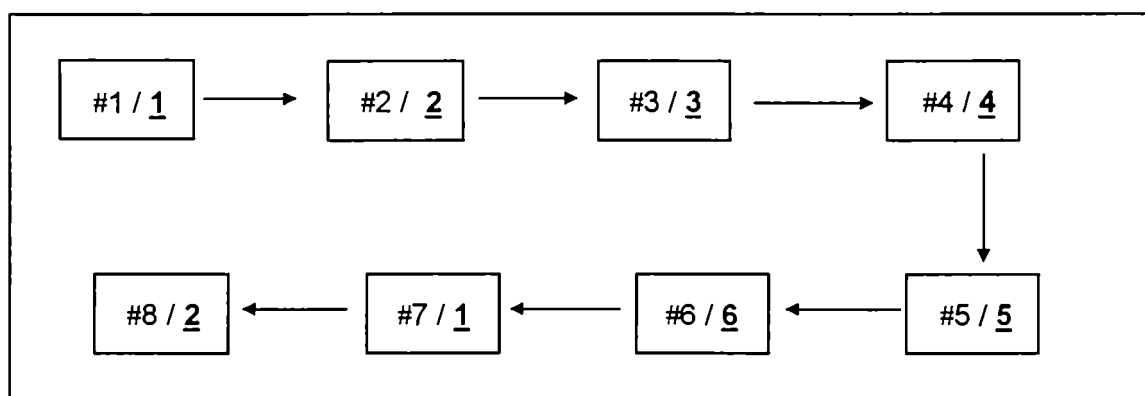


Figura 4.11. Protocolo utilizado en el estudio del efecto de soluciones de distinta fuerza iónica sobre los distintos electrodos. Se indica mediante flechas y el símbolo # la secuencia temporal seguida. Los números (negrita, subrayados) representan la solución utilizada como carrier, según la tabla 4.6.

Dos importantes efectos produce el cambio de la fuerza iónica del medio. En ausencia de sustrato se observa un cambio en el potencial pico del polímero, a medida que aumenta la fuerza iónica del medio se observa un corrimiento del mismo a valores más catódicos. En la figura 4.12 se observan los voltamogramas obtenidos para un electrodo modificado (sin PEG) en presencia de las soluciones 1, 3 y 5

(según tabla 4.6). Cuando el electrodo vuelve a sumergirse en la solución 1 (menor fuerza iónica) se observa prácticamente el mismo voltamograma que fue previamente registrado a esa concentración. En la figura 4.12 también puede observarse que si bien hay un corrimiento en la corriente pico, el valor de la misma prácticamente no cambia, lo mismo sucede con la carga, no existe una variación importante en el área de pico, por lo cual puede inferirse que la sal no tienen efecto en el mecanismo de propagación de la carga. La tabla 4.7 resume estos parámetros para las siete concentraciones de PEG ensayadas.

PEG / PAAOs	Nitrato, mM	Epa	Epc	$\Delta E$	ipa	ipc
4	100	278,0	254,2	23,8	1,510	-1,380
4	500	252,6	239,3	14,3	1,612	-1,478
4	1000	247,5	232,6	14,9	1,689	-1,571
4	100	277,5	254,2	23,3	1,591	-1,508
2	100	274,1	262,2	11,5	1,183	-1,108
2	500	250,9	242,5	10,4	1,174	-1,154
2	1000	245,9	235,8	10,1	1,247	-1,221
2	100	275,9	265,8	10,1	1,565	-1,218
0,66	100	275,9	267,4	8,5	1,629	-1,580
0,66	500	254,2	245,9	8,3	1,624	-1,696
0,66	1000	249,1	237,7	11,4	1,689	-1,756
0,66	100	279,1	269,3	9,8	1,760	-1,673
0,33	100	267,4	257,6	9,8	2,676	-2,666
0,33	500	251,0	240,9	10,1	2,700	-2,892
0,33	1000	244,3	217,5	26,8	2,779	-2,430
0,33	100	274,1	260,8	13,3	2,813	-2,836
0,11	100	269,3	260,8	8,5	2,509	-2,435
0,11	500	252,6	244,3	8,3	2,423	-2,459
0,11	1000	245,9	237,7	8,2	2,340	-2,479
0,11	100	275,9	260,8	15,1	2,485	-2,414
0,022	100	272,5	262,6	9,9	3,333	-3,216
0,022	500	254,2	247,5	6,7	3,002	-2,968
0,022	1000	247,5	239,3	8,2	2,900	-2,868
0,022	100	277,5	264,2	13,3	3,143	-2,930
0	100	269,3	265,8	3,5	2,359	-2,244
0	500	252,6	251,0	1,6	2,108	-1,975
0	1000	247,5	240,1	7,4	2,143	-1,896
0	100	275,9	265,8	10,1	2,386	-2,058

Tabla 4.7. Resumen de los parámetros importantes de las voltametrías cíclicas realizadas sin sustrato, distinta fuerza iónica.

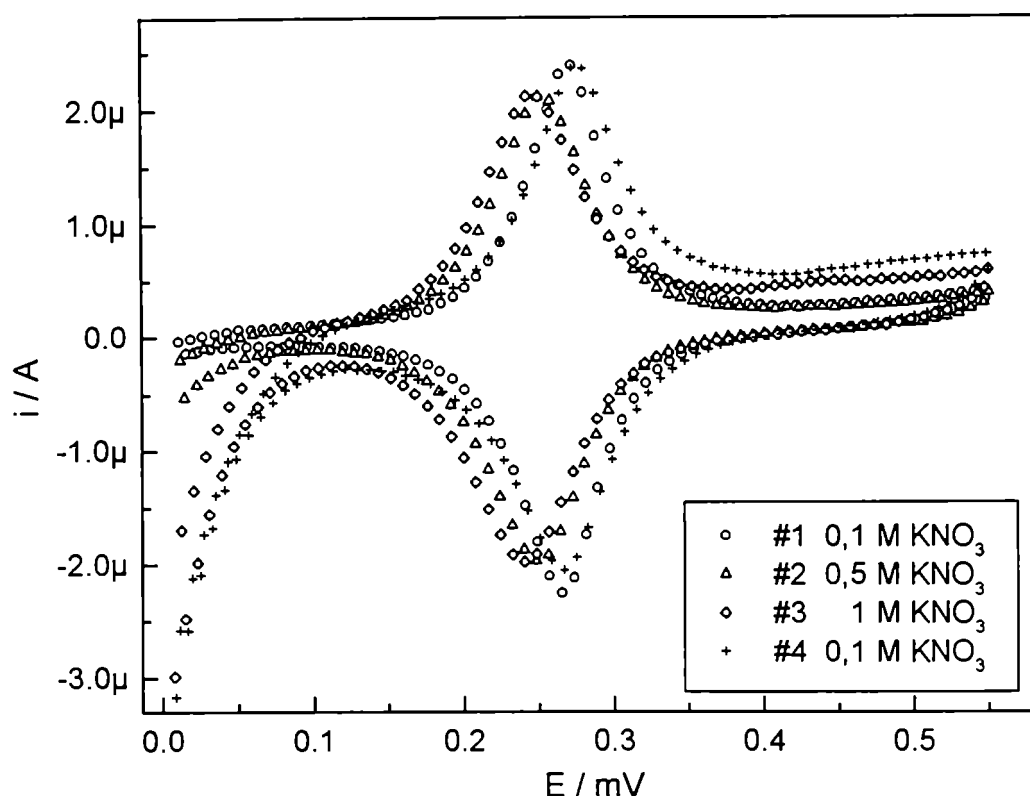


Figura 4.12. Comportamiento de un electrodo (PEG / PAAOs = 0) en soluciones de distinta fuerza iónica, en ausencia de glucosa.

Las corrientes obtenidas en las diferentes soluciones muestran un comportamiento aleatorio, pero cuyas diferencias son menores al 10 %. Los resultados obtenidos en cuanto al corrimiento del potencial de pico muestran la misma tendencia que lo realizados con PAA modificada con derivados del ferroceno ( $\text{FeCp}_2\text{PAA}$ ) utilizando un electrodo multicapas <sup>5</sup> (capas de polímero electroactivo unidas electrostáticamente con glucosa oxidasa) o en electrodos formados por un polímero no ordenado <sup>6</sup>, como en nuestro sistema.

En presencia de sustrato (glucosa 10 mM) las corrientes catalíticas difieren notablemente en presencia de distintas concentraciones de  $\text{KNO}_3$ , tanto para electrodos modificados con o sin entrecruzante. Para concentraciones de  $\text{KNO}_3$  1000 mM las corrientes catalíticas se reducen entre un 25 y 40 % del valor obtenido con una solución conteniendo 100 mM. La caída en la corriente catalítica al incrementarse la concentración salina sugiere una fuerte interacción electrostática entre el polímero

redox, cargado positivamente, y la glucosa oxidasa, cargada negativamente a pH 7,0. Un efecto similar fue observado <sup>2</sup> utilizando poly(1-vinylimidazol) complejoado con Os(dmbpy)<sub>2</sub>Cl (siendo dmbpy = 4,4' - dimetil - 2,2' - bipyridina). Este efecto, de similar magnitud utilizando NaCl para incrementar la concentración salina <sup>2</sup> puede ser explicado por el apantallamiento producido sobre el polímero redox (policación) por los aniones salinos. También sugiere que el uso de PEG no produce un entrecruzamiento rígido del gel.

Otros autores <sup>7</sup> utilizando el siguiente polímero redox [Os(bpy)<sub>2</sub>-(PVI)<sub>10</sub>Cl] donde (PVI)<sub>10</sub> es poli(N-vinylimidazol) y bpy es 2,2'-bipyridina consideran que el principal efecto del cambio de fuerza iónica en el medio son la modificación de las propiedades físicas del gel, que originan cambios en las distancias entre los centros de Osmio y la enzima, como también las velocidades de difusión, tanto de sustratos como productos de la reacción enzimática en el seno del gel redox.

Si luego de mantener un electrodo en una solución conteniendo KNO<sub>3</sub> 1000 mM se retorna a una solución 100 mM se recupera gran parte de la corriente catalítica. En la figura 4.13 se observan las corrientes catalíticas obtenidas al circular en la celda wall-jet las soluciones 2 , 4 y 6 y nuevamente la 2, al final de la experiencia. La tabla 4.8 resume los datos obtenidos.

PEG / PAOs	Secuencia temporal / solución utilizada							
	#1 / <u>1</u>	#2 / <u>2</u>	#3 / <u>3</u>	#4 / <u>4</u>	#5 / <u>5</u>	#6 / <u>6</u>	#7 / <u>1</u>	#8 / <u>2</u>
4	0,57	<b>5,36</b>	0,47	3,24	0,53	2,45	0,63	<b>7,10</b>
2	0,48	<b>4,25</b>	0,33	2,32	0,39	1,72	0,49	<b>5,29</b>
0,66	0,51	<b>3,88</b>	0,38	2,09	0,43	1,61	0,53	<b>5,00</b>
0,33	0,72	<b>10,05</b>	0,68	4,81	0,64	3,27	0,56	<b>8,98</b>
0,11	0,35	<b>12,36</b>	0,39	5,03	0,43	3,01	0,48	<b>9,06</b>
0,022	0,35	<b>13,05</b>	0,27	5,56	0,39	3,26	0,43	<b>9,39</b>
0	0,29	<b>13,66</b>	0,27	6,67	0,33	4,57	0,60	<b>11,13</b>

Tabla 4.8. Corrientes (μA) medidas a v = 400 mV vs. SCE (hemiciclo anódico). Velocidad de barrido 2 mV/seg. En ausencia o presencia de glucosa 10 mM, distinta fuerza iónica. Los números en negrita subrayados corresponden a las soluciones de la tabla 5.4.

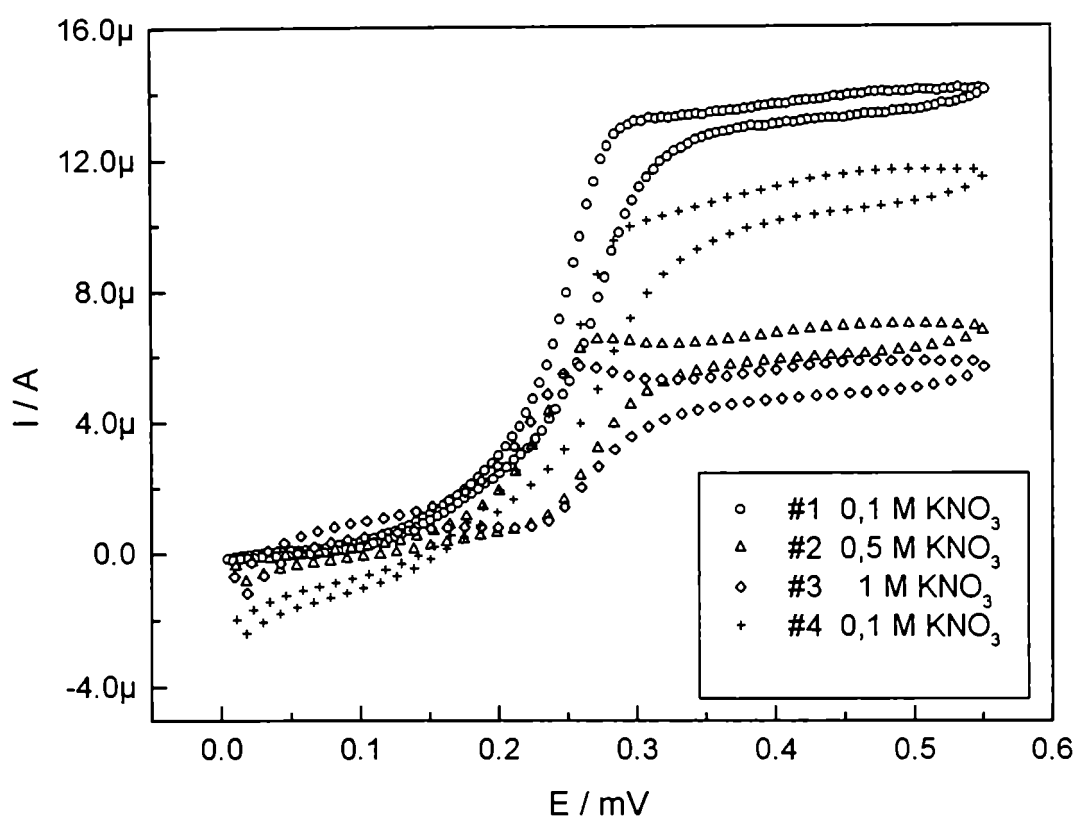


Figura 4.13. Comportamiento de un electrodo (PEG / PAAOs = 0) en soluciones de distinta fuerza iónica, en presencia de glucosa 10 mM.

La tabla 4.9 permite apreciar en forma comparativa las variaciones de corriente catalítica, en presencia de glucosa 10 mM para los distintos electrodos. El efecto de caída de corriente al aumentar la fuerza iónica es algo menos importante en los electrodos con mayor concentración de PEG. También se observa que cuando la concentración de PEG es elevada, las corrientes al final de la experiencia son mayores que al comienzo, efecto que también se había observado en los ensayos de estabilidad en el sistema FIA.

PEG / PAAOs	#4 versus #2	#6 versus #2	#8 versus #2
4	60,45%	45,71%	132,46%
2	54,60%	40,47%	124,47%
0.66	53,86%	41,50%	128,87%
0.33	45,16%	32,54%	88,46%
0.11	40,70%	24,35%	73,30%
0.22	42,60%	24,98%	71,95%
0	48,83%	33,46%	81,47%

Tabla 4.9. Comparación de las corrientes catalíticas medidas a +400 mV vs. ECS, en flujo de carrier + glucosa 10 mM.

#### 4.5. Efecto del pH en las corrientes catalíticas.

Los electrodos se ensayaron variando el pH, según se describe en el Capítulo 3.7. En la figura 4.14 se observa que el pH óptimo del sensor está alrededor de las 9 unidades de pH.

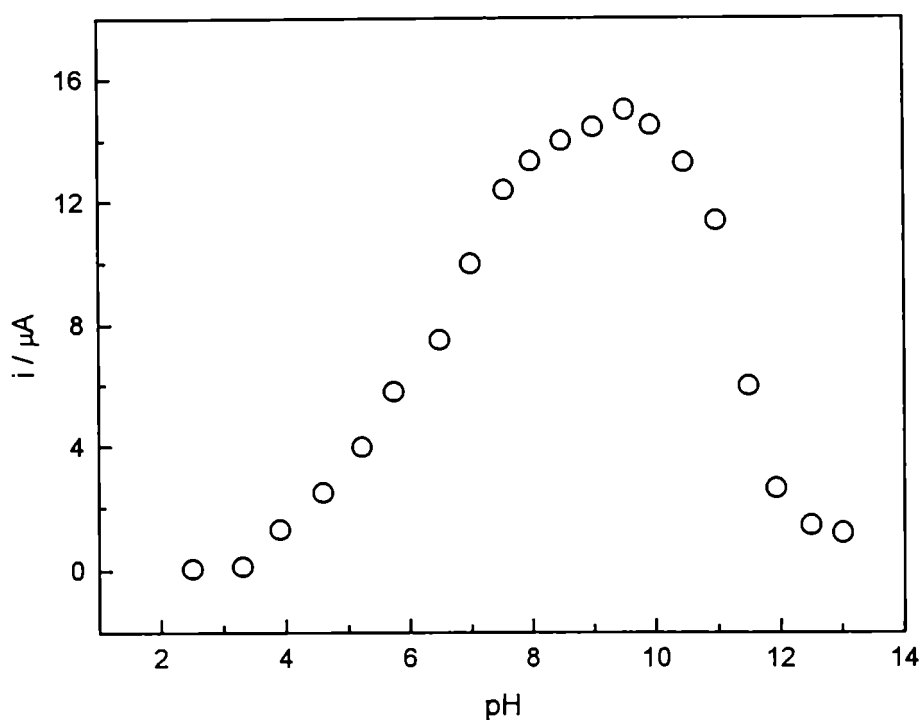


Figura 4.14. Efecto del pH sobre las corrientes catalíticas (glucosa 5 mM) en el sistema FIA.

El pH óptimo para esta enzima en solución <sup>8</sup> es de 5,6 - 6,0. La máxima respuesta en nuestro sistema se encontró a valores más básicos. Esto puede ser explicado considerando los siguientes factores: 1) La matriz polimerica del gel redox, lo que produce un microambiente en el que el pH puede diferir considerablemente del pH en el seno de la solución <sup>9</sup> ; y 2) El producto de la reacción, el ácido glucónico puede provocar cambios importantes de acidez en la matriz del gel <sup>10</sup> , máxime considerando que los ensayos se realizaron con una concentración relativamente alta de glucosa, cercana al límite de linealidad en estos electrodos.

De todas maneras, este comportamiento en la GOx inmovilizada (pH optimo más alcalino) se ha observado en la mayoría de los ensayos realizados por otros autores <sup>11-12</sup>.

Los sensores fueron ensayados en rangos de pHs extremos, observándose que luego de una corta exposición (2 minutos) a pH 13,0 el electrodo se recupero en parte, entregando el 66% de la señal inicial; a pH 2,5 la recuperación de la señal fue aún mayor, del 77% de la señal inicial.



#### **4.6. Efecto de la temperatura en las corrientes catalíticas.**

La estabilidad de los electrodos modificados en un amplio rango de temperatura se estudio incrementando la temperatura de la celda electroquímica mientras que se registraban las corrientes producidas; el protocolo y electrodos utilizados se describe en el capítulo 3.8.

Los resultados indican (figura 4.15.) que la corriente catalítica aumenta hasta aproximadamente los 60 °C, luego la corriente disminuye, posiblemente por la pérdida de actividad de la GOx. Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos con esta misma enzima inmovilizada en otros materiales poliméricos <sup>7</sup>. Otros autores han descripto valores máximos de corriente a temperaturas entre 35 y 45°C, dependiendo de los materiales poliméricos utilizados <sup>3</sup>. Esto significa un aumento de la estabilidad de la enzima, respecto a la enzima en solución, un efecto conocido como estabilización por inmovilización, debido principalmente a fenómenos estéricos.

Luego se regresó el sistema a temperatura ambiente, registrándose que la perdida de corriente catalítica a altas temperatura (85°C) fue irreversible, probablemente por desnaturalización de la glucosa oxidasa. La figura 4.15 resume los resultados obtenidos.

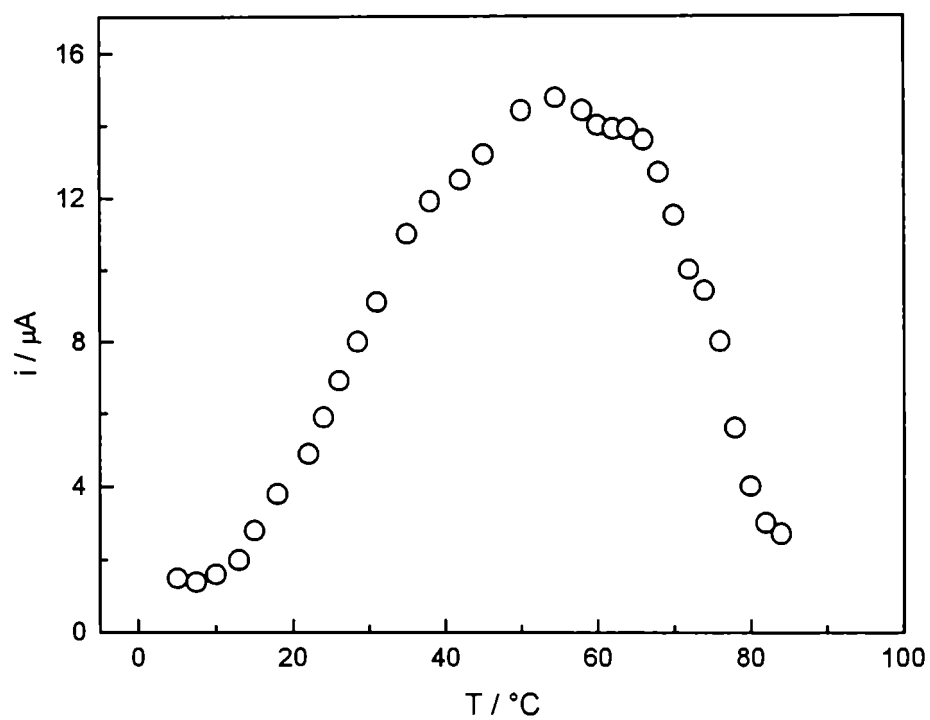


Figura 4.15. Efecto de la temperatura en las corrientes catalíticas, en presencia de glucosa (5 mM). El ensayo se realizó en celda electroquímica con agitación magnética.

#### 4.7. Referencias

1. Gregg, B.; Heller, A.; *Anal. Chem* **62** (1990) 258.
2. Ohara T.; Rajagopalan R.; Heller A.; *Anal. Chem.* **66** (1994) 2451.
3. Sasso, S.; Pierce, J.; Walla, R.; Yacynych, A.; *Anal. Chem.* **62** (1990) 1111.
4. Lyons M.; Greer J.; Fitzgerald C.; Bannon T.; Barlett, P.; *Analyst* **121** (1996) 715.
5. Hodak J.; Etchenique R.; Calvo E.; Singhal K.; Barlett, P.; *Langmuir Journal* **12** (1997) 708.
6. Battaglini F.; Calvo E.; Danilowicz C.; Wolosiuk A.; *Anal. Chem.* **71**(1999) 1062.
7. Daigle F.; Leech D.; *Anal. Chem.* **69** (1997) 4108.
8. Swoboda B.; Massey V.; *Journal of Biological Chemistry* **240** (1965) 2209.
9. Cosnier S.; Innocent C.; *Analytical Letters* **27** (1994) 1429.
10. Koopal C.; Nolte R.; *Electrochemistry and Bioenergetics* **33** (1994) 45.
11. Guilbault G.; Lubrano G.; *Analitica Chemistry Acta* **64** (1973) 439.
12. Snejdárková M.; Reháček M.; Otto, M.; *Anal. Chem.* **65** (1993) 665.

## 5. RESULTADOS OBTENIDOS CON ELECTRODOS BASADOS EN LACTATO OXIDASA

### 5.1. Mecanismo de reacción

De manera similar a lo referido en la sección 4.1, los electrones provenientes de la oxidación del L-lactato, catalizada por la lactato oxidasa (LOx), son transferidos mediante los centros redox de la PAAOs hacia la superficie del electrodo de trabajo, como muestra la figura 5.1. El oxígeno, cofactor fisiológico de la lactato oxidasa, no es necesario en este sistema.

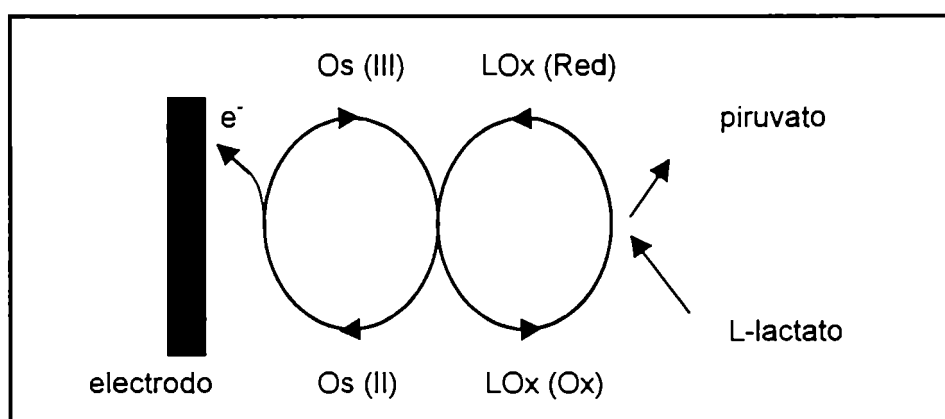


Figura 5.1. Transferencia de masa y carga en un electrodo basado en lactato oxidasa, en presencia de L-lactato. Os ( ) representa los centros redox del polímero, y su estado de oxidación.

### 5.2. Efecto de distintas concentraciones de proteína

La actividad de LOx es considerablemente menor que la de GOx (34 UE / mg versus 200 UE / mg), por lo tanto, una nueva relación entre polímero, entrecruzante y enzima debió ser investigada.

Elevadas concentraciones de proteína (lactato oxidasa en este caso) en los sensores cableados puede actuar como aislante entre los centros redox de la PAAOs, observándose una disminución de las corrientes medidas tanto en presencia como en ausencia de sustrato <sup>1</sup>. La cantidad de enzima inmovilizada influye también en la respuesta de los sensores (sensibilidad) y en la estabilidad de los electrodos en el tiempo <sup>2</sup>.

Con el objeto de estudiar estos parámetros, se ensayaron electrodos cuya composición fue la siguiente, sobre electrodos de carbón vítreo de 5,5 mm de diámetro:

64 % proteínas 2,5 µl PAAOs (0,3%) + 4 µL LOx (1%) + 1,5 µL PEG (1%)

47 % proteínas 2,5 µL PAAOs (0,3%) + 2 µL LOx (1%) + 1,5 µL PEG (1%) + 2 µL agua

15 % proteínas 2,5 µL PAAOs (0,3%) + 4 µL LOx (0,1%) + 1,5 µL PEG (1%)

Donde la solución de LOx se preparó como se indica en la sección 3.2.1, y X % proteínas es el % p / p de proteínas (provenientes de la solución LOx) respecto a los demás componentes (PAAOs y PEG).

### 5.2.1. Propagación de carga y reversibilidad.

La figura 5.2 muestra voltametrías cíclicas en buffer fosfatos para electrodos modificados con 64 % de proteínas (círculos llenos) y para 15 % de proteínas (círculos vacíos). Se observa que si bien ambos poseen la misma cantidad de polímero electroactivo, la proteína produce un importante efecto aislante, en consecuencia el electrodo con mayor cantidad presenta un comportamiento menos reversible y menor corriente. El electrodo con 47 % de proteína presenta un comportamiento similar al de 64 %.

Las cargas medidas en los distintos electrodos (hemiciclo ánodico, 2 mV / seg) fue de 714 µCoul / cm<sup>2</sup>, 606 µCoul / cm<sup>2</sup> y 280 µCoul / cm<sup>2</sup> para los electrodos que contienen 64 %, 47 % y 15 % de proteína, respectivamente.

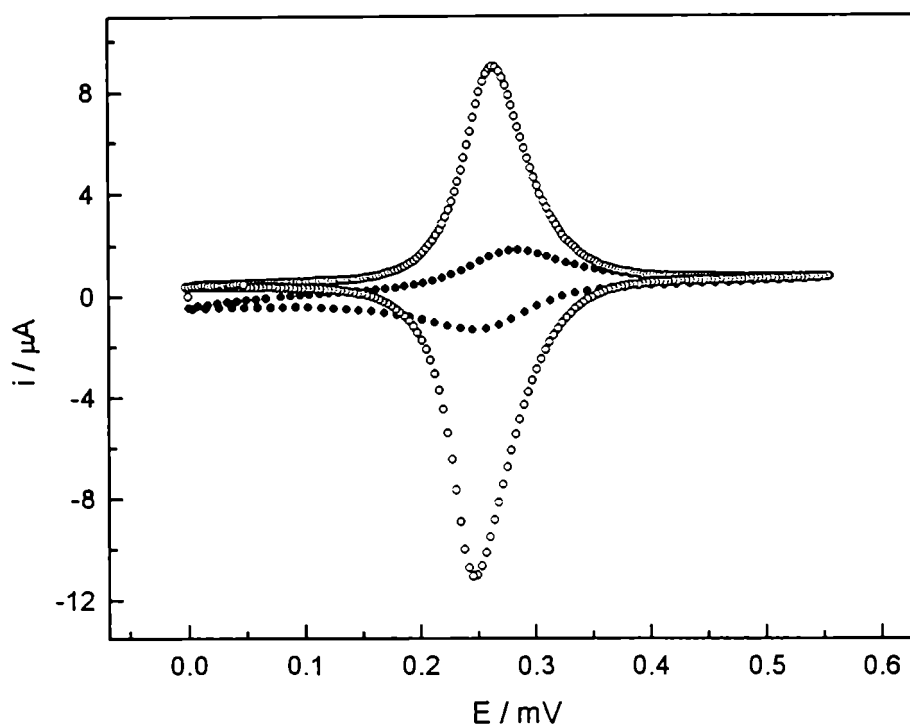


Figura 5.2. Voltametrías cíclicas en tampón fosfatos.  $V = 5 \text{ mV / seg.}$  Electrodo 64 % proteína (círculos llenos) y 15 % proteína (círculos vacíos). Se midió  $\Delta E$  ( $E_{pa} - E_{pc}$ ), siendo mayor para el electrodo 64 % de proteína (38 mV vs 17 mV).

### 5.2.2. Modificación de las voltametrías por el agregado de lactato.

En las mismas condiciones que el punto anterior, se llevó la concentración de lactato a 5 mM y se registraron voltametrías cíclicas para los electrodos. Las figuras 5.3 y 5.4 muestran que las corrientes catalíticas alcanzan prácticamente el mismo máximo, aproximadamente  $9 \mu\text{A}$ , pero la forma de las curvas son notablemente diferentes. Para el electrodo 15 % de proteína (figura 5.3) se observa un pico catódico, esto se debe a una deficiente cantidad de enzima que no alcanza a "cablear" todos los sitios redox del polímero. Por otro lado, para el electrodo con 65 % de proteína, se observa una típica onda catalítica, existe suficiente cantidad de enzima para rodear todos los centros redox, que en algunos casos producen aislamiento del polímero.

Al aumentar la concentración de enzima aumenta la posibilidad de oxidar L-lactato, pero de la misma manera aumenta la acción aislante de la proteína entre los centros redox de Os, que se ven imposibilitados de transferir carga hasta la superficie del electrodo. En algunos sistemas no cableados<sup>3</sup> se alcanza saturación de corriente con una concentración de aproximadamente 1,8 U.E. / cm<sup>2</sup> de electrodo, (siendo una Unidad Enzimática igual a la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1  $\mu$ M de L-lactato en un minuto a pH = 6,5 y 37 °C); en nuestro sistema esta concentración de enzima óptima es de aproximadamente 2,8 U.E. / cm<sup>2</sup>. Corrientes catalíticas máximas iniciales se registraron en los electrodos con una concentración intermedia de enzima, como puede observarse en la tabla 5.1.

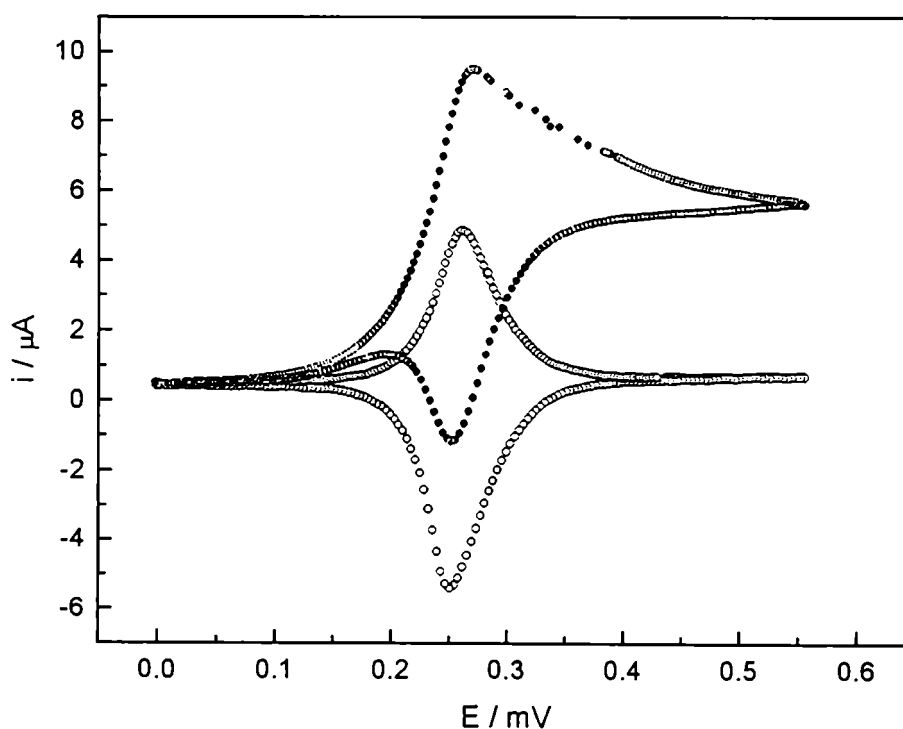


Figura 5.3. Electrodo LOx, 15 % de proteínas. Voltametrías cíclicas en solución tampón fosfatos (círculos vacíos) y en tampón más lactato 5 mM (círculos llenos).  $V = 2 \text{ mV / seg.}$

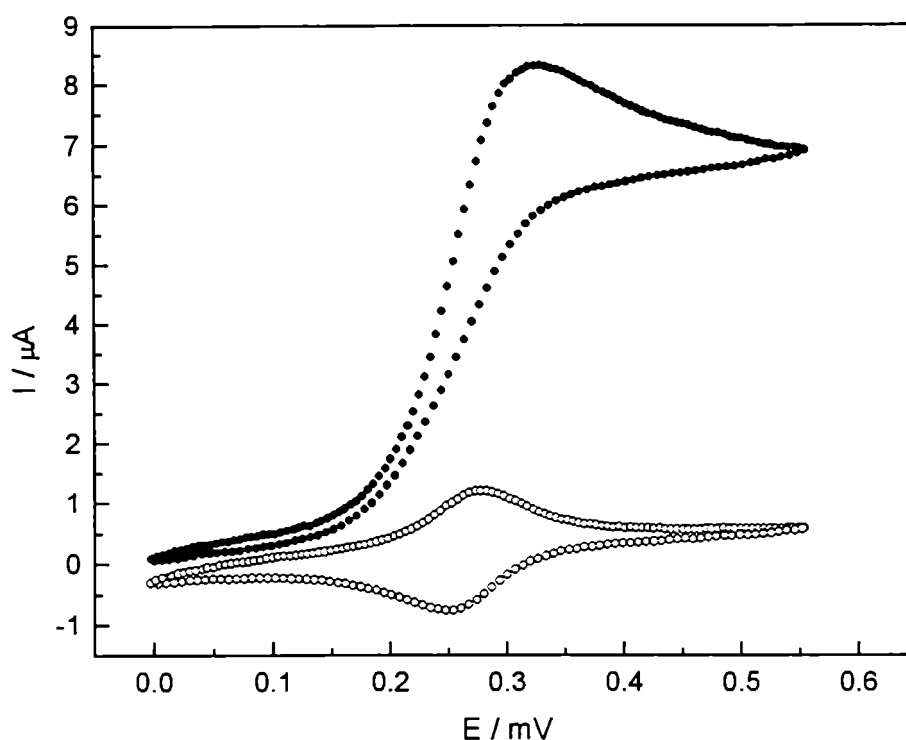


Figura 5.4. Electrodo LOx, 64 % de proteínas. Voltametrías cíclicas en solución tampón (círculos vacíos) y en tampón más lactato 5 mM (círculos llenos).  $V = 2 \text{ mV / seg.}$

### 5.2.3. Estabilidad de la membrana catalítica.

Los electrodos se mantuvieron en heladera, a 5 grados centígrados en atmósfera húmeda. Se midió la caída de corriente catalítica para una concentración 5 mM de lactato. Los resultados se resumen en la tabla 5.1.

Electrodo	Carga de LOx	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21
64 % proteínas	$168,3 \mu\text{g / cm}^2$	$7,1 \mu\text{A}$	$3,9 \mu\text{A}$	$2,8 \mu\text{A}$	$0,4 \mu\text{A}$
47 % proteínas	$84,1 \mu\text{g / cm}^2$	$9,6 \mu\text{A}$	$4,2 \mu\text{A}$	$2,1 \mu\text{A}$	$0,2 \mu\text{A}$
15 % proteínas	$16,8 \mu\text{g / cm}^2$	$6,2 \mu\text{A}$	$1,6 \mu\text{A}$	$0,3 \mu\text{A}$	No medible

Tabla 5.1. Estabilidad de los electrodos basados en LOx. Se mido la diferencia de corriente (tampón vs tampón + 5 mM lactato) a un potencial de + 400 mV vs ECS.



Como puede observarse en la tabla 5.1, la estabilidad en el tiempo de estos biosensores es mayor a mayores concentraciones enzimáticas en la superficie del electrodo. Este fenómeno ha sido informado<sup>4</sup> en otros biosensores basados en LOx, en los que se han ensayado concentraciones de entre 8 y 320  $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ , observándose que la estabilidad está directamente relacionada con la carga enzimática sobre el electrodo.

### 5.3. Efecto del pH en las corrientes catalíticas

Se estudio la variación en la corriente producida por efecto del cambio de pH, en un amplio rango. El protocolo utilizado se describe en la sección 3.7.

En la figura 5.5 se observa que el pH óptimo del sensor esta alrededor de las 8 unidades de pH. Similares resultados (pH 7,5 - 8,0) fueron obtenidos por otros autores utilizando LOx cableada con otros polímeros redox<sup>5 - 6</sup>. Utilizando esta enzima sobre electrodos no cableados, inmovilizando la enzima en poli(vinilalcohol) con detección electroquímica de peróxido<sup>2</sup> los valores óptimos de pH se encuentran entre 7,0 y 9,0. La lactato oxidasa en solución tiene un pH óptimo<sup>2</sup> entre 6,0 y 7,0. Los sensores fueron ensayados en rangos de pHs extremos (aquellos valores de pH en los que la corriente registrada se acerca a 0  $\mu\text{A}$ ), observándose que luego de una corta exposición (2 minutos) a pH 11,2 el electrodo pierde de manera irreversible su actividad al ser ensayado a pH 7,0; lo mismo ocurre al ser expuesto a pH 4,4.

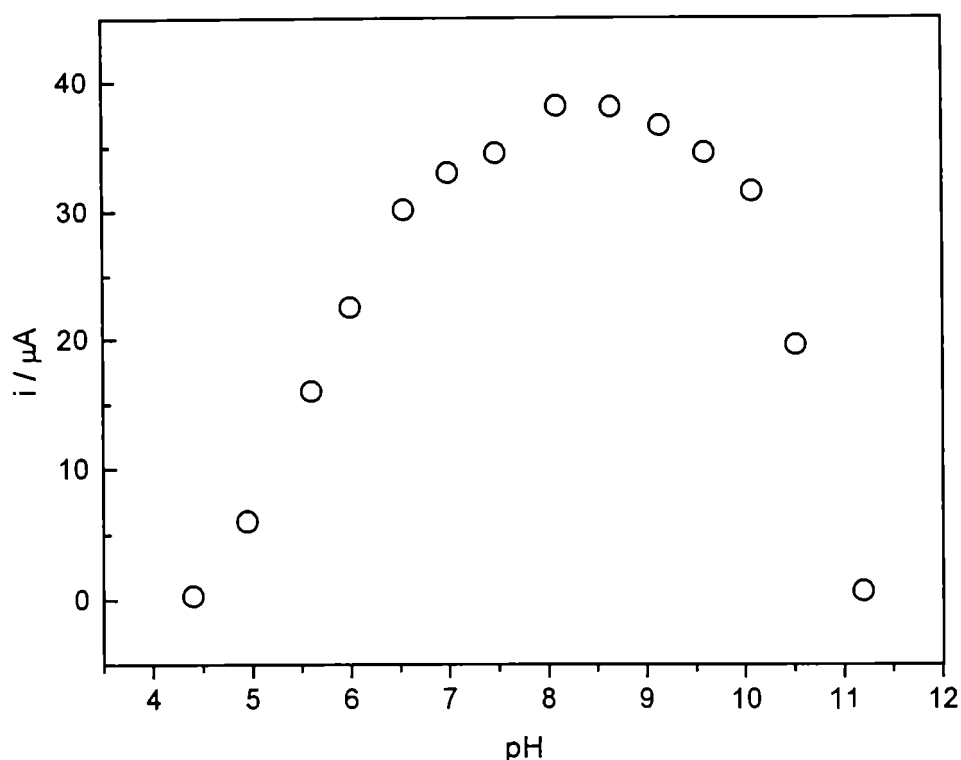


Figura 5.5. Efecto del pH sobre las corrientes catalíticas (lactato 2,5 mM) en el sistema FIA.

#### 5.4. Efecto de la temperatura en las corrientes catalíticas

La estabilidad de los electrodos modificados en un amplio rango de temperatura se estudio incrementando la temperatura de la celda electroquímica mientras que se registraban las corrientes producidas. El protocolo utilizado se describe en el capítulo 3.8.

La enzima en solución <sup>7</sup> tiene una temperatura óptima de 35 °C, y retiene la mayor parte de su actividad hasta 45 °C. Los resultados indican que la corriente catalítica aumenta hasta aproximadamente los 37 °C, luego la corriente disminuye, indicando la perdida de actividad de la LOx. Luego de alcanzar los 55 °C, se colocó el electrodo a temperatura ambiente, registrándose que la perdida de corriente catalítica fue irreversible, probablemente por desnaturalización de la lactato oxidasa. La figura 5.8 resume estos resultados. Estos son similares a los publicados utilizando lactato oxidasa inmovilizada en otros materiales poliméricos <sup>8</sup> y a las características de esta enzima en solución. Otros autores han descripto valores máximos de corriente <sup>2</sup> a

temperaturas de entre 60 y 65°C; esto significa un aumento de la estabilidad de la enzima, respecto a la enzima en solución, un efecto conocido como estabilización por inmovilización, debido principalmente a fenómenos estéricos.

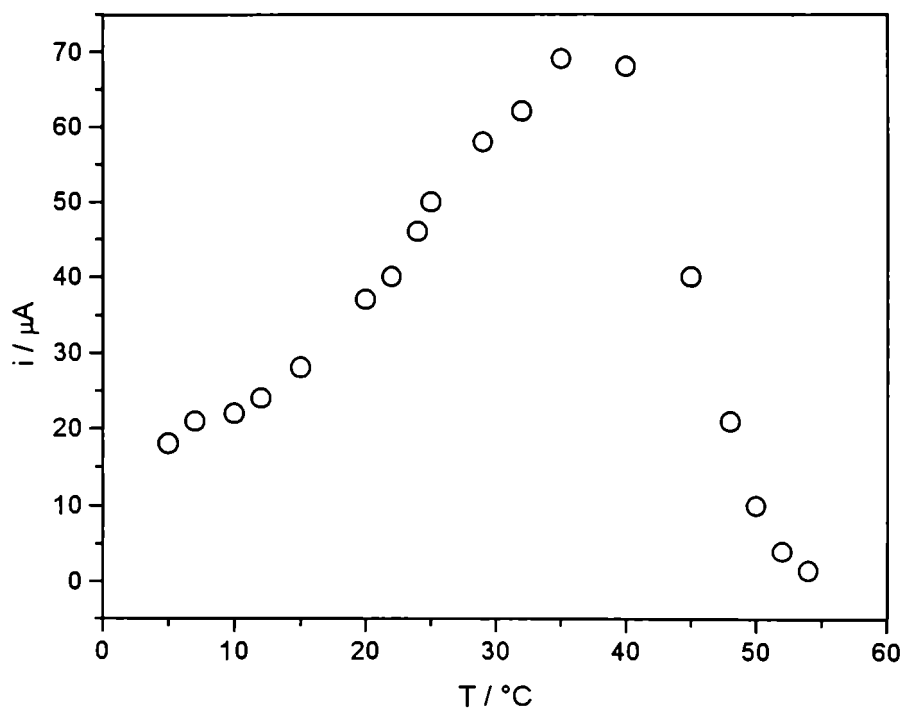


Figura 5.6. Efecto de la temperatura en las corrientes catalíticas, en presencia de L-lactato (2,5 mM). El ensayo se realizó en celda electroquímica con agitación magnética.

## 5.5. Referencias

1. Garguilo M.; Huynh N.; Proctor A.; Michael A.; *Anal. Chem.* **65** (1993) 523.
2. Hajizadeh K.; Halsall B.; Heineman W.; *Talanta* **38** (1991) 37.
3. Pfeiffer D.; Setz K.; Schulmeister T.; Scheller F.; Luck H.; Pfeiffer D.; *Biosensors and Bioelectronics* **7** (1992) 661.
4. Khan G.; Wernet W.; *Anal. Chem.* **69** (1997) 2682.
5. Wang D.; Heller, A.; *Anal. Chem.* **65** (1993) 1069.
6. Kim N.; Haginoya R.; Karube I.; *Journal of Food Science* **61** (1996) 286.
7. Radola B.; Delincee H.; *Ann. Technol. Agr.* **21** (1972) 473.
8. Keniausis G.; Chen Q.; Heller A.; *Anal. Chem.* **69** (1997) 1054.

## 6. RESULTADOS OBTENIDOS CON ELECTRODOS BASADOS EN GLUCOSA Y LACTATO OXIDASA EN MEDIOS COMPLEJOS

### 6.1. Comportamiento en solución tampón pH 7,0 y en presencia de leche

Electrodos de oro modificados (4,5  $\mu\text{g}$  PAAOs + 1,5  $\mu\text{g}$  LOx + 1,5  $\mu\text{g}$  PEG) se estudiaron mediante técnicas de voltametría cíclica. En la figura 6.1 se observa su comportamiento en solución tampón fosfato, en ausencia y en presencia de lactato (5 mM) y al colocarlo en medio de leche (sección 3.2.2.) sin o con agregado de lactato (5 mM). Como puede observarse, el electrodo sumergido en leche + lactato prácticamente no muestra corriente catalítica. La voltametría en medio de leche sin lactato muestra que a potenciales superiores a 250 / 300 mV las corrientes son mayores a las registradas en solución tampón; posiblemente este aumento se deba a la presencia de sustancias electroactivas en la leche, como ha sido informado por otros autores <sup>3</sup>. Además, los voltamogramas realizados en medios de leche corresponden a un proceso mas irreversible que en tampón, apoyando la apreciación realizada; se postuló que uno o varios componentes de la leche producían la inactivación de la enzima, la desconexión de la enzima y los centros de Osmio del polímero redox o ambos fenómenos.

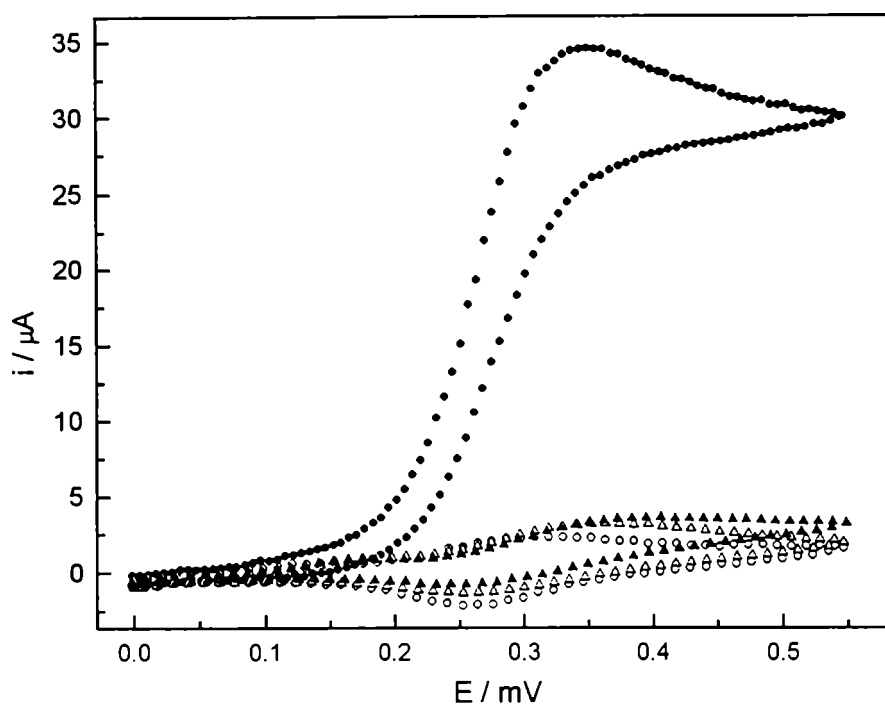


Figura 6.1. Electrodo monoenzimático basado en lactato oxidasa. Círculos, en tampón pH 7,0; triángulos en leche. Símbolos llenos en presencia de lactato 5 mM, símbolos abiertos sin lactato agregado. Se realizaron voltametrías cíclicas en batch,  $V = 2 \text{ mV / seg.}$

Luego de permanecer en medio de leche, se transfirió el electrodo a solución tampón, observándose que la pérdida de señal fue irreversible. Se realizaron ensayos similares con electrodos basados en glucosa oxidasa, obteniéndose resultados comparables.

## 6.2. Efecto de fracciones de la leche en el comportamiento de los electrodos

Se decidió emplear algunos métodos sencillos para investigar la naturaleza de las sustancias que interferían en el funcionamiento de nuestro sistema en medio de leche. El objetivo fue obtener información que permitiera avanzar en sistemas de protección del electrodo enzimático que posibilitaran su funcionamiento en este y otros medios complejos. Para ello la leche fue separada en distintas fracciones, los

procedimientos empleados en las separaciones se encuentran en el Capítulo 3 de esta Tesis.

### 6.2.1. Fracciones separadas por peso molecular

Utilizando una bolsa de diálisis (corte molecular de 12000 KD) se separaron las fracciones de la leche de alto peso molecular (mayormente caseínas) de las de bajo peso molecular, como se informa en la sección 3.9 de esta Tesis.

Hemos medido las variaciones de corriente a +400 mV vs ECS entre las voltametrías en presencia de L-lactato (2,5 mM) y en ausencia de L-lactato; los datos obtenidos se resumen en la tabla 6.1. Dado que el ensayo es generalmente destructivo, a cada tratamiento corresponden distintos electrodos de similares características.

	Tratamiento	
	Leche	Dializado
1) En solución tampón	9,68 $\mu\text{A}$	13,6 $\mu\text{A}$
2) En tratamiento	0,3 $\mu\text{A}$	0,71 $\mu\text{A}$
3) Luego del tratamiento, en tampón	2,95 $\mu\text{A}$	1,95 $\mu\text{A}$

Tabla 6.1. Efecto del medio de leche y del dializado (fracción de PM > 12000) en la corriente catalítica. Se utilizaron electrodos basados en LOx.

Se observó que la fracción retenida por la membrana de diálisis produce un efecto similar al observado en la figura 6.1, inactivando irreversiblemente al electrodo enzimático.

### 6.2.2. Fracciones separadas por precipitación ácida

Acidificando la leche (protocolo en sección 3.9.2) se obtiene un precipitado formado principalmente por caseínas. El precipitado obtenido se redisuelve mayoritariamente a pH 7,0. Muestras de esta solución producen el mismo comportamiento que el observado en la tabla 6.1, mientras que el suero (fracción

soluble a pH = 4) produce menor inactivación, como puede observarse en la tabla 6.2. Los números entre paréntesis expresan el porcentaje de corriente catalítica remanente respecto a la inicial.

	Tratamiento	
	Fracción caseína	Fracción albúminas + globulinas
1) En tampón	8,39 $\mu$ A	11,53 $\mu$ A
2) En tratamiento	1,53 $\mu$ A (18,2%)	7,17 $\mu$ A (62,2%)
3) Luego del tratamiento, en tampón	0,41 $\mu$ A (4,8%)	2,94 $\mu$ A (25,5%)

Tabla 6.2. Efecto de fracciones proteicas separadas por precipitación ácida. Se emplearon electrodos basados en GOx. Entre paréntesis porcentajes referidos al inicial, en tampón.

### 6.3. Ensayo de otros componentes mayoritarios de la leche

La lactosa y el calcio son componentes muy importantes (en peso) de la leche y de otros productos lácteos. Se ensayó su efecto sobre los electrodos en concentraciones máximas similares a la leche. Se preparó una solución de  $\text{CaCl}_2$ , que contiene 10 g  $\text{Ca}^{++}$  / l, y una solución 200 g / l de lactosa. Se agregaron al batch para conseguir las concentraciones respectivas en los ensayos, que corresponden aproximadamente a los valores normales en leche, 1 g / l de  $\text{Ca}^{++}$  y 47 g / l de lactosa.

Se observó (tabla 6.3.) que estas sustancias no afectan el comportamiento de los electrodos.

	Tratamiento		
	Leche	Calcio	Lactosa
1) En tampón	9,68 $\mu$ A	11,6 $\mu$ A	10,7 $\mu$ A
2) En tratamiento	0,3 $\mu$ A	11,16 $\mu$ A	9,6 $\mu$ A
3) Luego del tratamiento, en tampón	2,95 $\mu$ A	12,84 $\mu$ A	9,5 $\mu$ A

Tabla 6.3. Efecto del calcio (1g / l) y lactosa (47 g / l) en el comportamiento de biosensores enzimáticos. Se emplearon electrodos basados en LOx. La concentración de L-lactato en las voltametrías correspondientes es de 2,5 mM.



#### 6.4. Comportamiento en plasma sanguíneo

La medición de glucosa y lactato es muy importante en química clínica, y existen biosensores enzimáticos que pueden operar en plasma o suero, basados algunos en las mismas enzimas utilizadas en este trabajo <sup>6-7</sup>, en su mayoría sistemas no cableados (biosensores de primera o segunda generación). La pregunta que intentamos responder con estos ensayos es si nuestro sistema es especialmente frágil, o si la leche es una matriz mucho mas perjudicial para los sensores diseñados.

La tabla 6.4 muestra los resultados obtenidos, el plasma sanguíneo no produce inactivación del electrodo.

	Tratamiento
	Plasma
1) En tampón	3,1 $\mu$ A
3) En tratamiento	4,5 $\mu$ A
4) Luego del tratamiento, en tampón	2,85 $\mu$ A

Tabla 5.6. Efecto del plasma en las corrientes catalíticas. Se emplearon electrodos basados en GOx. La concentración de glucosa en el tampón fue de 4,5 mM. El electrodo se colocó en plasma sin dilución alguna.

Una alícuota de esta muestra de plasma se midió en el sistema FIA. La concentración de glucosa determinada fue de 14,5 mM; la glucosa en el plasma fue también medida por métodos clínicos estándar, obteniéndose un resultado de 3,72 mM. Al potencial de trabajo (+ 400 mV) la influencia en las mediciones de los compuestos electroactivos del plasma, como el ascorbato y otros darían cuenta del error por exceso obtenido. Los sistemas comerciales utilizan membranas u otras estrategias para evitar estas interferencias.

## 6.5. Resultados obtenidos utilizando mediador soluble

La posibilidad de inactivación de las enzimas en leche fue estudiada utilizando el mismo sistema de inmovilización sobre electrodos de oro, reemplazando al polímero redox por polialiamina (PAA) sin el complejo de osmio. En este sistema (no cableado), la transferencia de electrones desde la enzima hasta la superficie del electrodo de trabajo ocurre si está presente en la solución algún mediador soluble; en los biosensores que emplean mediadores solubles (también denominados biosensores de segunda generación) tanto la enzima como el mediador suelen estar en solución, siendo el mediador oxidado (o reducido) en la superficie del electrodo de trabajo, difundiendo luego a la solución donde reacciona con la enzima. De esta manera, el mediador reducido (o oxidado) generado puede difundir nuevamente hacia el electrodo completando el ciclo. Se han utilizado diversos derivados del ferroceno<sup>8-9</sup>. Nosotros utilizamos ferroceno sulfonato de amonio, el que transfiere los electrones involucrados en la catálisis, si la enzima presenta actividad. El electrodo se colocó en la celda wall-jet, y se polarizó a 400 mV vs ECS.

La figura 6.2 muestra que, las corrientes producidas son prácticamente las mismas cuando leche o buffer es utilizado como carrier en el sistema de inyección en flujo, mostrando que la enzima no es inhibida o inactivada por los componentes de la leche, y que la posible adsorción de componentes de la leche sobre la superficie del electrodo no explica la inactivación del mismo o una importante disminución de las corrientes catalíticas producidas.

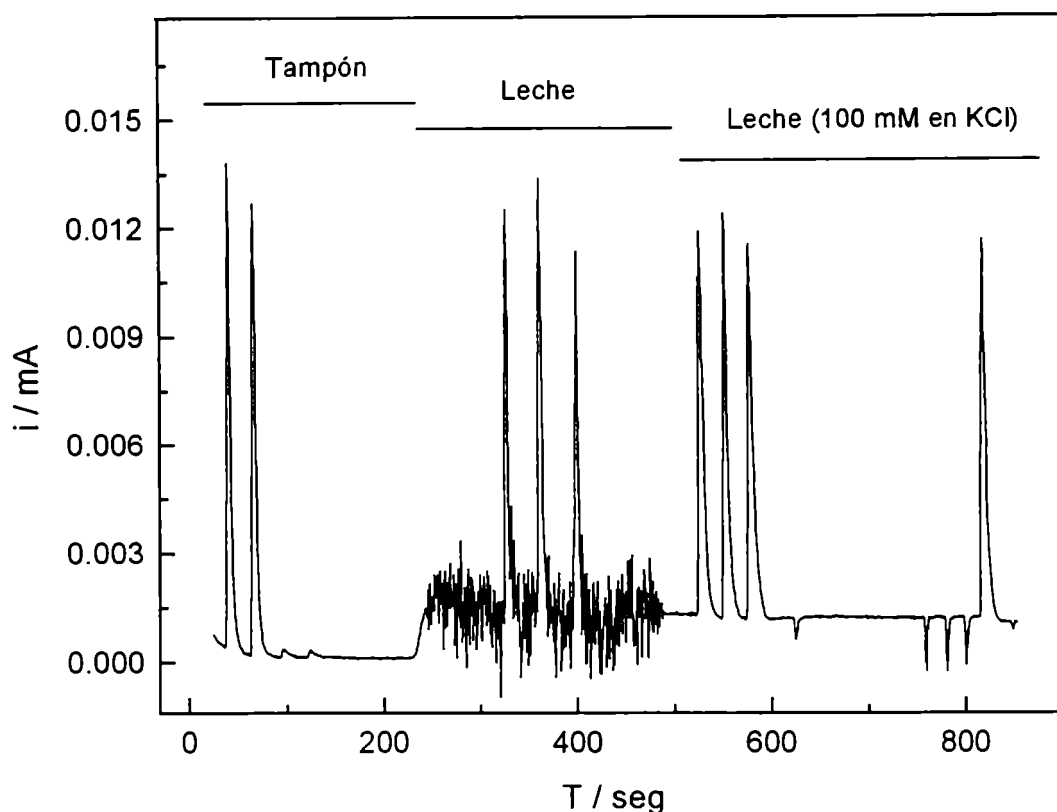


Figura 6.2. Electrodo basado en glucosa oxidasa + PAA + PEG. Se utilizó como detector en un sistema FIA, velocidad de flujo 1,5 ml / min , polarizado a + 400 mV vs ECS. Se utilizó tampón o leche como carrier, según se indica. Los picos son patrones de glucosa 10 mM + ferroceno sulfato amonio 0,1 mM. Los picos invertidos corresponden a inyecciones de tampón, mientras que los picos pequeños en flujo de tampón corresponden a glucosa 10 mM sin mediador soluble.

Estos resultados sugieren que posiblemente algún componente de la leche interfiera o desconecte a la enzima de los centros redox de la PAAOs, impidiendo la transferencia de los electrones de la oxidasa reducida al mediador redox.

Al circular leche como carrier, la línea de base se muestra muy ruidosa. El agregado de KCl (100 mM) a la leche elimina este efecto, por lo que posiblemente se deba a la menor conductividad del medio de leche respecto al tampón (fosfatos 50 mM + KCl 100 mM) utilizado habitualmente como carrier. También puede observarse que la línea de base, utilizando leche como carrier es mas alta (mayor corriente) que

en el caso del tampón; esto es debido a las sustancias electroactivas de la leche, que reaccionan al potencial del electrodo de trabajo, + 400 mV vs ECS.

Teniendo en cuenta que la corriente producida en los electrodos amperométricos mediados depende fuertemente de la concentración del mediador soluble, se realizaron experimentos con electrodos basados en PAA, sin el complejo de osmio, en el cual el carrier fue adicionado con mediador, de manera tal de que la diferencias de corriente entre la línea de base y las inyecciones de glucosa 10 mM + mediador correspondan inequívocamente a la catálisis de la glucosa en la superficie del electrodo de trabajo. Los resultados obtenidos se gráficán en la figura 6.3.

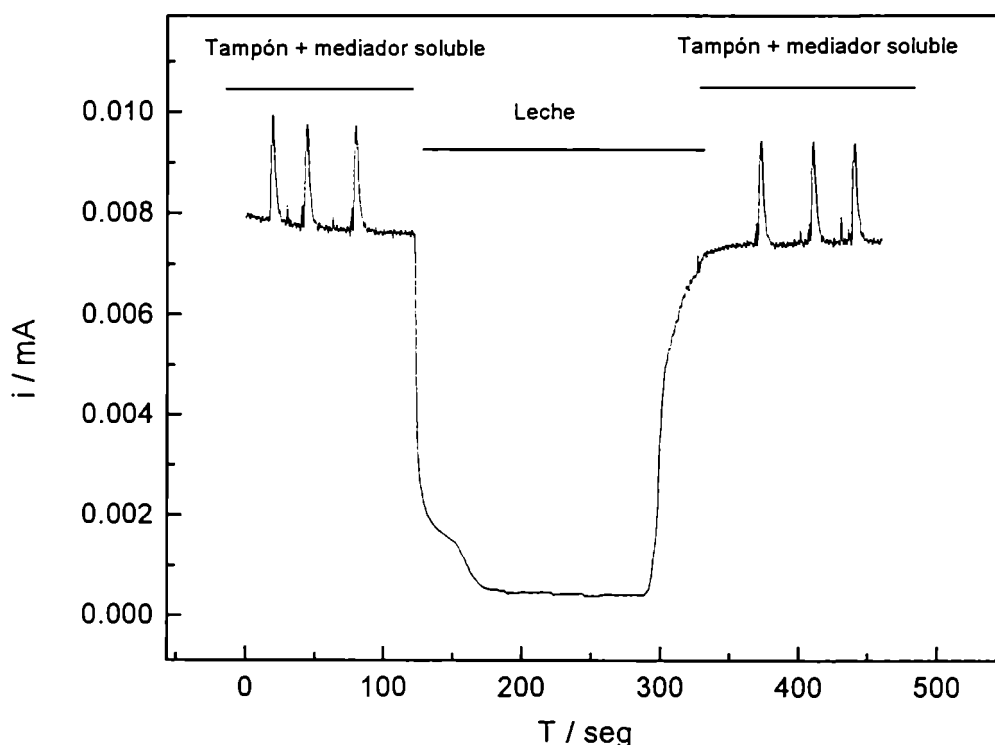


Figura 6.3. Electrodo basado en PAA y GOx. En el sistema FIA, polarizado a 400 mV vs ECS. Picos de glucosa 10 mM.

Se confirmó de esta manera que la enzima no es afectada de manera importante por los componentes de la leche, y que esta no bloquea la superficie del electrodo, ya que al volver a usar solución tampón como carrier las corrientes catalíticas son similares a las obtenidas antes del uso de leche. Se consideró la

hipótesis de que algún componente de la leche de alto peso molecular, impidiera la comunicación eléctrica entre la el polímero redox (PAAOs) y la enzima.

## **6.6. Ensayos con membranas protectoras**

Se decidió emplear membranas para intentar proteger los electrodos de los agentes que lo inactivan en leche. El uso de membranas aplicadas sobre el electrodo o construidas sobre el mismo han dado buenos resultados en los biosensores para determinar glucosa en sangre o derivados, evitando el pasaje de interferencias electroactivas.

### **6.6.1. Membranas de acetato de celulosa**

Membranas comerciales de diálisis (Sigma, corte molecular 12 KD), se colocaron y ajustaron mediante "O" rings sobre los electrodos enzimáticos. Se ensayaron en tampón y en medio de leche. Al colocar la membrana sobre los electrodos se dañaba el gel redox que contiene la enzima, y al utilizarlos en el sistema FIA la barrera difusiva impuesta por la membrana de diálisis era demasiado importante, registrándose solo el 6 % de la señal de un electrodo similar sin membrana de diálisis y en idénticas condiciones.

Se preparó una solución de acetato de celulosa (CA) en acetona, y se utilizó el método denominado deep-coating para obtener membranas de menor espesor que las comerciales sobre los electrodos. Este método consiste en sumergir los electrodos en la solución acetónica retirándolos inmediatamente; en unos 5-10 minutos la solución de acetona que quedó sobre el electrodo se evapora, quedando depositado sobre el electrodo una membrana CA. Se ensayaron concentraciones de CA entre 5 % y 0,5 %, y entre una y tres capas de CA formadas por deep-coating, sobre electrodos de oro modificados con PAAOs / LOx.

Solamente se obtuvieron electrodos funcionales con concentraciones de 0,5 % de CA, a mayores concentraciones la difusión del lactato a través de la membrana parece estar fuertemente limitada. En biosensores con una capa de CA la señal remanente (respecto a un electrodo gemelo sin membrana CA en tampón + lactato 2,5 mM, en condiciones estáticas) es del 50 %, tres capas de CA reducen las señales a un 8 %. Se ensayó el efecto protector al ser expuestos los electrodos a una solución de leche diluida 1:40 en solución tampón, observándose poco efecto protector de la CA en los electrodos; la caída de señal en estos disminuyó respecto a

los electrodos no protegidos en idénticas condiciones experimentales, como se obseva en la tabla 6.5.

	Electrodo	
	Sin CA	Con CA
En tampón	10,54 $\mu$ A	4,92 $\mu$ A
Luego de la exposición, en tampón	3,25 $\mu$ A (30,8 %)	2,16 $\mu$ A (43,9 %)

Tabla 6.5. Efecto protector de la membrana de acetato de celulosa (CA). Se emplearon electrodos basados en LOx. La concentración de L-lactato en las voltametrías correspondientes es de 2,5 mM.

#### 6.6.2. Membranas de nafi3n y otras membranas protectoras

El nafi3n es una mezcla de ion3meros del ácido perfluorosulf3nico de bajo peso molecular (peso equivalente 1000); las cargas negativas originadas por la presencia de los grupos sulfonato permite que las membranas producidas con este material excluya o repela aniones <sup>10</sup>. Se postul3 que la carga negativa de esta membrana podr3a evitar que las case3nas u otros compuestos de igual carga alcanzaran la superficie del electrodo.

Se ensayaron membranas de nafi3n, producidas por fraguado directo sobre electrodos enzimáticos basados en GOx, a partir de una soluci3n alcoh3lica de nafi3n al 5 %; se utilizaron 10  $\mu$ l por cada capa de nafi3n, y se colocaron los electrodos a 5 °C durante 2 horas.

Se prepararon electrodos con una o dos capas de nafi3n, y se ensayaron de igual manera que en la secci3n 6.6.1. El nafi3n polimeriza formando finas membranas que poseen carga negativa a pH neutro.

Este procedimiento disminuy3 de manera apreciable la corriente entregada por los electrodos en tamp3n + glucosa (30 % respecto a un electrodo gemelo sin membrana de nafi3n), y no se observ3 efecto protector al exponer a los electrodos a medios basados en leche.

Se ensay3 el efecto de una capa de gelatina (soluci3n 3%) sobre el electrodo; este procedimiento inutiliza al electrodo. Una capa de agar-agar (soluci3n 2%) es compatible con el funcionamiento del electrodo en tamp3n, pero no proporciona

efecto protector en leche. BSA (2 % p / v) entrecruzada con glutaraldeído (0,1 % v / v) generó similares resultados.

#### **6.7. Respuesta y estabilidad en muestras lácteas diluidas en buffer**

Habiéndose observado que medios complejos basados en leche destruían irreversiblemente al sensor basado en PAAOs / Oxidasa, se estudió la acción de distintas diluciones de leche, con el objeto de conocer a que dilución de este medio podría ser utilizado el sensor.

Una experiencia típica puede observarse en la figura 6.4, donde se muestra que diluciones 1:20 del medio de leche no afectan, al menos en el corto plazo, al sensor de L-lactato, pero que diluciones 1:3 destruyen al sensor en pocos minutos.

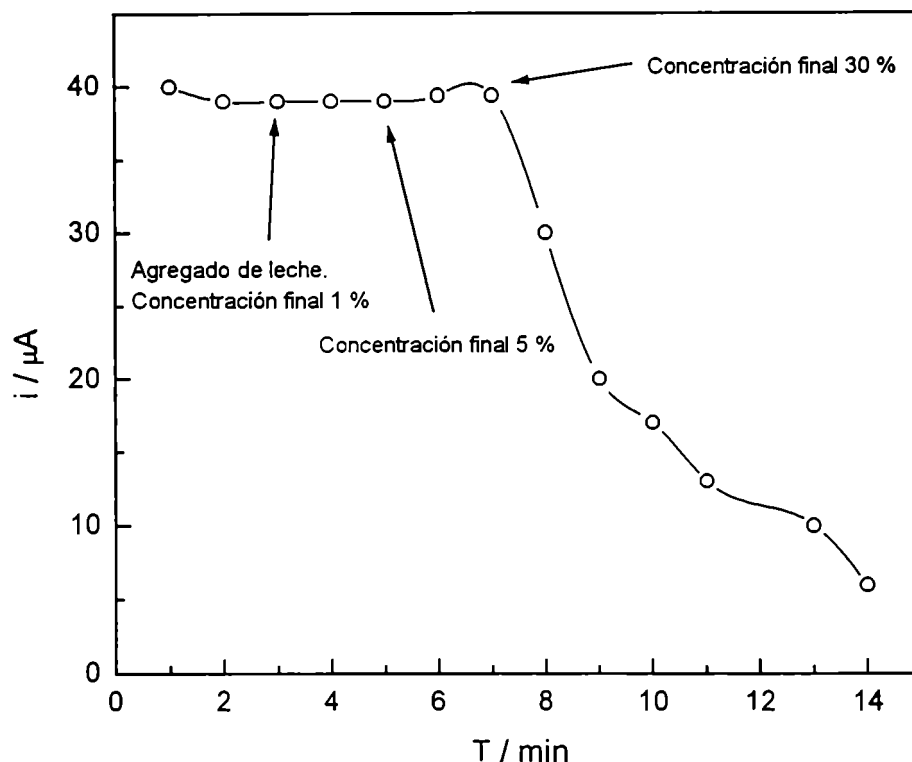


Figura 6.4. Efecto de la leche en la señal de un electrodo basado en LOx. Temperatura de medición 38 °C y agitación, en batch. Concentración de L-lactato 5 mM. Se agregó leche sobre solución tampón hasta alcanzar las concentraciones (% v / v) indicadas en la figura. Electrodo polarizado a + 400 mV vs ECS.

Cuando los electrodos son utilizados como detectores en el sistema de inyección en flujo, en las condiciones por nosotros empleadas (loop 70  $\mu$ l y velocidad de flujo 1,5 ml) la muestra entra en contacto con el sensor durante aproximadamente 6 segundos, por lo que se estudió la estabilidad de los biosensores basados en LOx cuando se inyectan en el sistema muestras provenientes de fermentaciones lácticas sobre leche inoculada con *Lactobacillus*.

Las muestras fueron diluidas 1:10 en carrier (tampón fosfatos + KCl) e inyectadas en el sistema FIA. En la figura 6.5 se registran inyecciones de patrones de



lactato cada seis muestras de leche 1:10, y puede observarse la disminución de las corrientes catalíticas entregadas por el sistema.

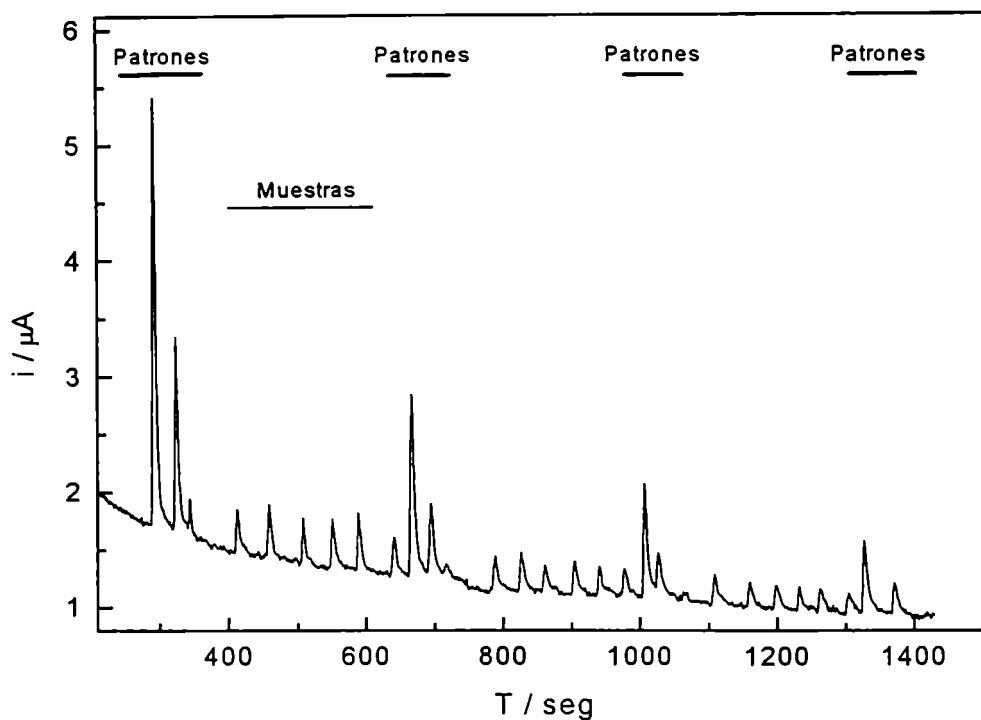


Figura 6.5. Se inyectaron patrones de L-lactato (1 mM; 0,5 mM y 0,1 mM) durante la medición de muestras de leche en dilución 1:10.

Se siguió la caída de la señal utilizando los picos de calibración con el patrón 1 mM L-lactato. Luego de la medición de 18 muestras basadas en leche y 18 minutos, la señal entregada por el sistema es de solo el 17 % de la señal inicial. Biosensores similares pierden menos del 10 % de señal en más de dos horas de uso continuo en soluciones tampón.

Los datos correspondiente a los valores de corrientes (patrones de calibración) de la figura 6.5 se han tabulado (tabla 6.6)

Concentración L-lactato	Valor de corriente para las sucesivas calibraciones, $\mu\text{A}$			
1 mM	3,72	1,58	0,99	0,63
0,5 mM	1,66	0,61	0,32	0,27
0,1 mM	0,28	0,11	0,09	0,05

Tabla 6.6. Pérdida de corriente catalítica al inyectar en el sistema FIA muestra de leche en dilución 1:10. Los valores tabulados corresponden a la figura 6.5.

## 6.8. Referencias

1. Hale P.D.; Boguslavsky L.I.; Inagaki T.; Karan H.I.; Lee S.H.; Skotheim T.A.; *Anal. Chem.* **63** (1991) 677.
2. Ohara T.J.; Vreeke M.S.; Battaglini F.; Heller A.; *Electroanalysis* **5** (1993) 825.
3. Collier W.A.; Janssen D.; Hart A.L.; *Biosensors and Bioelectronics* **11** (1996) 1041.
4. Fundamentals of Dairy Chemistry. Wong N.P. Editor. Van Nostrand Reinhold, New York, 1988.
5. Ciencia de la Leche, Alais C. Editor, Reverte, Barcelona, 1985.
6. Kyröläinen M.; Håkanson H.; Mattiasson B.; *Biotechnology and Bioengineering* **45** (1995) 122.
7. Baker D.A.; Gough D.A.; *Anal. Chem.* **67** (1995) 1536.
8. Cass A.E.G.; Davis G.; Francis G.D.; Hill H.A.; Aston W.J.; Higgins I.J.; Plotkin E.V.; Scott L.D.L.; Turner A.P.F.; *Anal. Chem.* **56** (1994) 667.
9. Battaglini F.; Calvo E.J.; *J. Electroanal. Chem.* **280** (1990) 443.
10. Nagy G.; Gerhardt G.A.; Oke A.F.; Rice M.E.; Adams R.N.; Moore R.B.; Szentirmay M.N.; Martin C.R.; *J. Electroanal. Chem.* **188** (1985) 85.

## 7. RESULTADOS OBTENIDOS CON ELECTRODOS BIENZIMATICOS BICAPA

### 7.1. Características de los electrodos construidos

En estos electrodos el elemento de reconocimiento (LOx) se encuentra separado del mediador y a su vez actúa como membrana evitando el pasaje de las fracciones proteicas de alto peso molecular de la leche.

El mediador redox para LOx es el oxígeno que genera peróxido de hidrógeno que a su vez difunde a través de las capas aislantes (PAA-PEG) reaccionando posteriormente con la peroxidasa (HRP). Esta oxida al complejo de Os, el cual se reduce en la superficie del electrodo a un potencial de trabajo de 0 mV vs. ECS.

Sistemas basados en oxidasa asociadas a peroxidasa en sistemas monocapa o bicapa han sido propuestos <sup>1 - 2</sup>, debido a que utilizando esta estrategia las reacciones de electrodo ocurren a menor potencial, por lo que se espera menos interferencia de sustancias electroactivas presentes en la muestra.

La figura 7.1 resume la cadena de eventos que culminan en la producción de una corriente mensurable en la superficie del electrodo de trabajo; como puede verse, un inconveniente de estos electrodos es que si la concentración de O<sub>2</sub> (cofactor fisiológico de las oxidasas) es baja, la respuesta del sistema dependerá de su concentración.

El potencial aplicado al electrodo de trabajo (0 mV vs ECS) es menor que en el electrodo LOx monocapa monoenzimático (+ 400 mV vs ECS), impidiendo que diversas moléculas <sup>3</sup> presentes en la leche y productos derivados reaccionen electroquímicamente en la superficie del electrodo de trabajo; algunos autores han utilizado sistemas con dos electrodos de trabajo <sup>4</sup>, siendo la función del segundo electrodo (no modificado enzimáticamente) descontar la corriente que no corresponde a la acción catalítica de la enzima inmovilizada que ocasiona un error por exceso.

Por último, la interacción electrostática entre algunos polímeros redox y las oxidasas (fenómeno principalmente estudiado en la glucosa oxidasa) es muy importante en el establecimiento de la comunicación eléctrica enzima-polímero redox <sup>5</sup>. Nosotros hemos comprobado (Capítulo 4.4.) que no es necesaria la presencia de

entrecruzante (PEG) para obtener una membrana catalítica funcionalmente estable; es posible que la principal fracción proteica de la leche, las caseínas,<sup>6</sup> sea atraída electrostáticamente, desplazando a las oxidasas en su interacción con el polímero redox, debido la carga neta fuertemente negativa (al pH utilizado) de las caseínas.

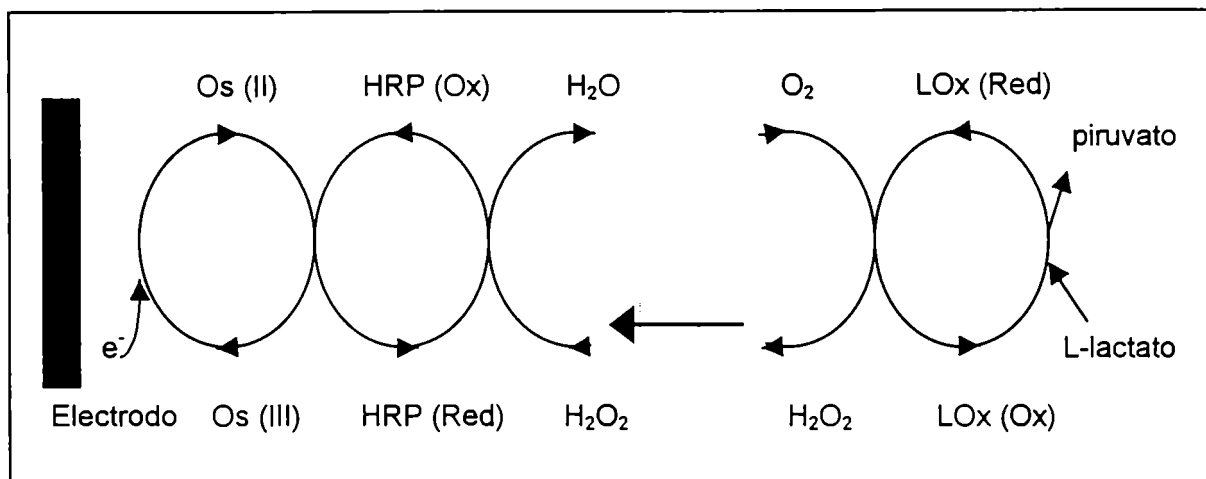


Figura 7.1. Transferencia de masa y carga en un electrodo bienzimático, en presencia de lactato. La doble línea (- - -) simboliza dos capas de PAA-PEG que evitan el contacto eléctrico entre la enzima “cableada” al electrodo (peroxidasa) y la enzima que no transfiere carga al electrodo (lactato oxidasa) en presencia de sustrato; el peróxido formado difunde hasta la capa interna de peroxidasa<sup>8</sup>

Una de las ventajas de separar las enzimas utilizadas es evitar la pérdida de corriente que se produciría si la lactato oxidasa se encontrara en la proximidad de la región rica en Os (III). En este caso la siguiente reacción<sup>7</sup> tendría lugar:



El efecto de esta reacción es un cortocircuito que disminuye la corriente catódica de electroreducción del Os(III) en la superficie del electrodo. Para evitar este fenómeno, han sido propuestos los sensores bienzimáticos bicapa formados por una capa interna de peroxidasa cableada y una capa externa formada por una oxidasa<sup>8</sup>.

## 7.2. Ensamblado de la monocapa HRP / PAAOs

Ensayamos la construcción de electrodos cableados basados en peroxidasa (monocapa-monoenzimáticos). Los primeros ensayos se realizaron sobre electrodos de oro, de 3 mm de diámetro. La composición de estos electrodos puede observarse en la tabla 7.1.

Material del electrodo	"Denominación"	HRP (0,4 %)	PAAOs (0,3 %)	PEG
Oro	A	1, 5 $\mu$ l / 6 $\mu$ g	1,5 $\mu$ l / 4,5 $\mu$ g	1,5 $\mu$ l / 15 $\mu$ g *
Oro	B	1, 5 $\mu$ l / 6 $\mu$ g	1,5 $\mu$ l / 4,5 $\mu$ g	1,5 $\mu$ l / 1,5 $\mu$ g **

Tabla 7.1. Composición de los electrodos construidos, monocapa monoenzimáticos basados en peroxidasa, sobre electrodos de 3 mm de diámetro. La concentración de la solución de PEG utilizada fue 1% (\*) o bien 0,1% (\*\*).

Las mayores corrientes catalíticas se obtuvieron con los electrodos denominados B, los que pueden observarse en la figura 7.2.

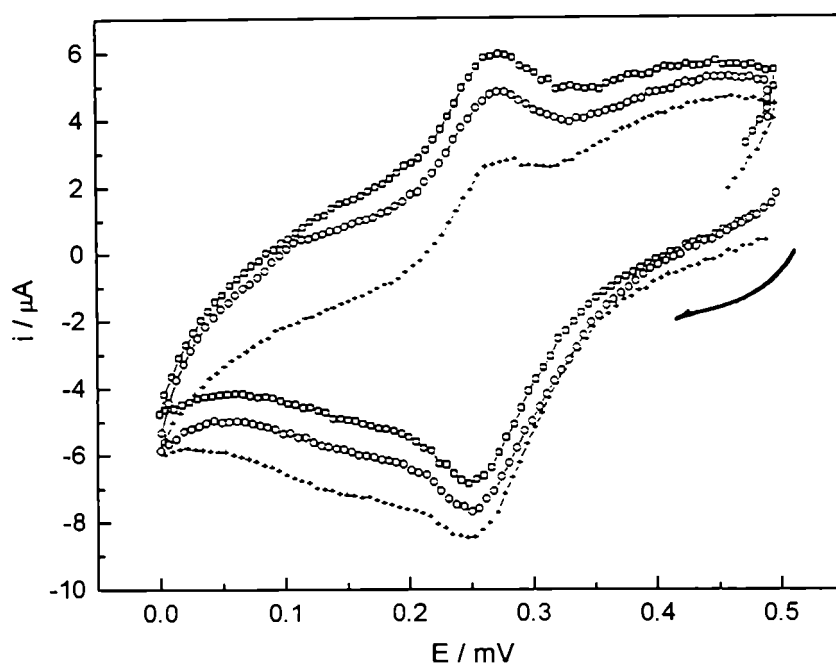


Figura 7.2. Electrodo HRP - PAAOs sobre oro. Voltametrías cíclicas  $V = 5 \text{ mV / seg}$ , en batch sin agitación, temperatura ambiente. Todas se realizaron en solución tampón, (□) sin peróxido de hidrogeno; (○) adicionado con peróxido 0,35 mM concentración final; (+) adicionado con peróxido 1,5 mM concentración final.

De todas maneras, las corrientes catalíticas alcanzadas fueron pobres comparadas con los datos de la bibliografía<sup>8-9</sup>, por lo que se decidió utilizar carbón vítreo como material de los electrodos (la adsorción del complejo de Os es favorecida en ese material) y disminuir la cantidad de enzima por unidad de superficie, considerando la elevada actividad catalítica de la peroxidasa utilizada. Se construyeron electrodos con la siguiente composición:

Material del electrodo	HRP (0,1 %)	PAAOs (0,3 %)	PEG (1%)
carbón vítreo	2,0 $\mu\text{l}$ / 2 $\mu\text{g}$	5,0 $\mu\text{l}$ / 15 $\mu\text{g}$	6,0 $\mu\text{l}$ / 60 $\mu\text{g}$

Tabla 7.2. Composición de los electrodos construidos, monocapa monoenzimáticos basados en peroxidasa, sobre electrodos de 5,5 mm de diámetro.

En estos electrodos se mantiene constante la concentración de PAAOs y se disminuye 10 veces la HRP por unidad de superficie, respecto al caso anterior. Los resultados obtenidos (figura 7.3) demuestran que las voltametrías cíclicas se modifican por el agregado de peróxido, y que la variación de corriente a 0 mV vs. ECS aumenta de manera directamente proporcional respecto a la concentración del sustrato de la enzima. Los valores de  $\Delta i$  a 0 mV vs ECS son importantes. Se utilizó este sistema como detector en el sistema de inyección en flujo (FIA) observándose rango lineal ( $r^2 = 0,999$ ) entre concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  y 1 mM de peróxido de hidrogeno; la corriente observada a la concentración máxima fue elevada, 26  $\mu\text{A}$  (112  $\mu\text{A} / \text{cm}^2$ ); otros autores usando HRP inmovilizada en otros sistemas han informado corrientes similares <sup>10</sup>. A concentraciones superiores a 1 - 1,5 mM, la corriente catalítica disminuye; este efecto ha sido observado por otros autores en sistemas similares <sup>11</sup> y es atribuible inhibición por sustrato, ya que concentraciones mayores a 2 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  causan inactivación de la enzima en solución <sup>12</sup>.

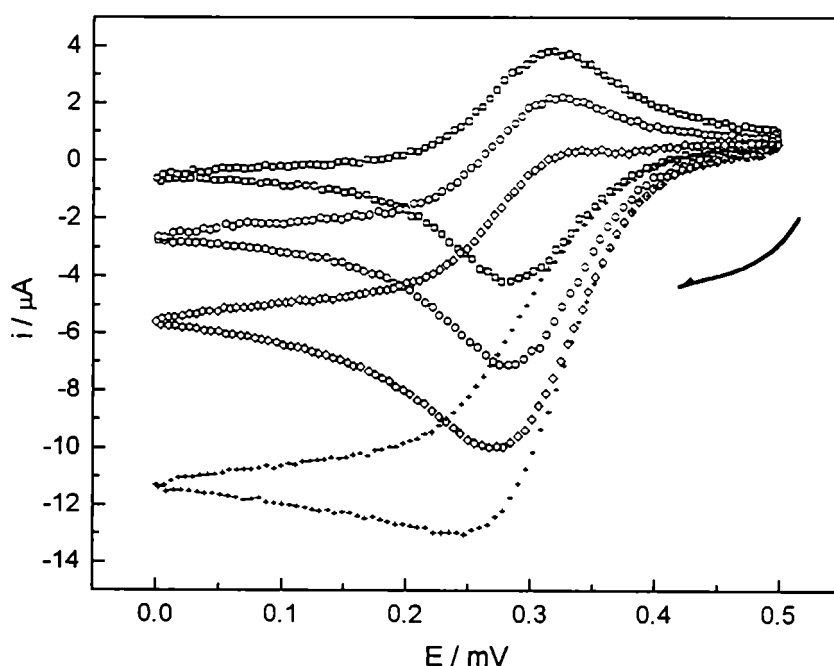


Figura 7.3. Electrodo HRP - PAAOs sobre carbón vítreo. Voltametrías cíclicas  $v = 5 \text{ mV} / \text{seg}$ , en batch sin agitación, temperatura ambiente. En solución tampón, ( $\square$ ) sin peróxido de hidrogeno, ( $\circ$ ) 0,6 mM peróxido, ( $\diamond$ ) 1,1 mM peróxido, (+) 4,0 mM peróxido.



### 7.3. Electrodos bienzimáticos bicapa

Se construyeron electrodos de acuerdo a lo detallado en el capítulo 3.5.1., de la composición denominada "bienzimático 1" (tabla 3.2.) donde LOx es entrecruzada con BSA y glutaraldehído. Se ensayaron mediante voltametrías cíclicas en batch, estos electrodos mostraron ser casi insensibles al L-lactato; sin embargo, su respuesta al peróxido fue similar a la que se puede ver en la figura 7.3. Por lo tanto, establecimos que la capa HRP / PAAOs funcionaba correctamente, y que las capas de aislante y de LOx no constituían una barrera difusiva importante para el peróxido. Evidentemente, la lactato oxidasa había sido desnaturalizada por el tratamiento con glutaraldehído / BSA.

Se fabricaron entonces los denominados "bienzimático 2" (tabla 3.2.), modificando la composición de la cuarta capa, utilizando la misma concentración de LOx que las anteriores, pero 100 veces menos de glutaraldehído y 10 veces menos de BSA. La respuesta al L-lactato también fue nula.

Decidimos utilizar otro método de inmovilización, para evitar la pérdida de actividad de la lactato oxidasa; se construyeron electrodos similares a los anteriores, denominados "bienzimático 3" (tabla 3.2.) en los que la inmovilización de LOx se realiza utilizando polialilamina / PEG.

Los datos de estos electrodos muestran buena sensibilidad al L-lactato, como puede verse en las voltametrías cíclicas de la figura 7.4.

Composición	Bienzimático 1	Bienzimático 2	Bienzimático 3	Bienzimático 4
1° capa	15 µg PAAOs	15 µg PAAOs	15 µg PAAOs	15 µg PAAOs
	2 µg HRP	2 µg HRP	2 µg HRP	3 µg HRP
	60 µg PEG	60 µg PEG	60 µg PEG	50 µg PEG
2° capa	18 µg PAA	18 µg PAA	18 µg PAA	18 µg PAA
	60 µg PEG	60 µg PEG	60 µg PEG	60 µg PEG
3° capa	18 µg PAA	18 µg PAA	18 µg PAA	150 µg LOx
	60 µg PEG	60 µg PEG	60 µg PEG	
4° capa	680 µg BSA	68 µg BSA	10 µg PAA	15 µg PAA
	40 µg LOx	40 µg LOx	33 µg LOx	50 µg LOx
	50 µg Glu.	0,5 µg Glu.	17 µg PEG	5 µg PEG

\* Tabla 3.2. Composición de los diferentes electrodos bienzimáticos bicapa construidos.

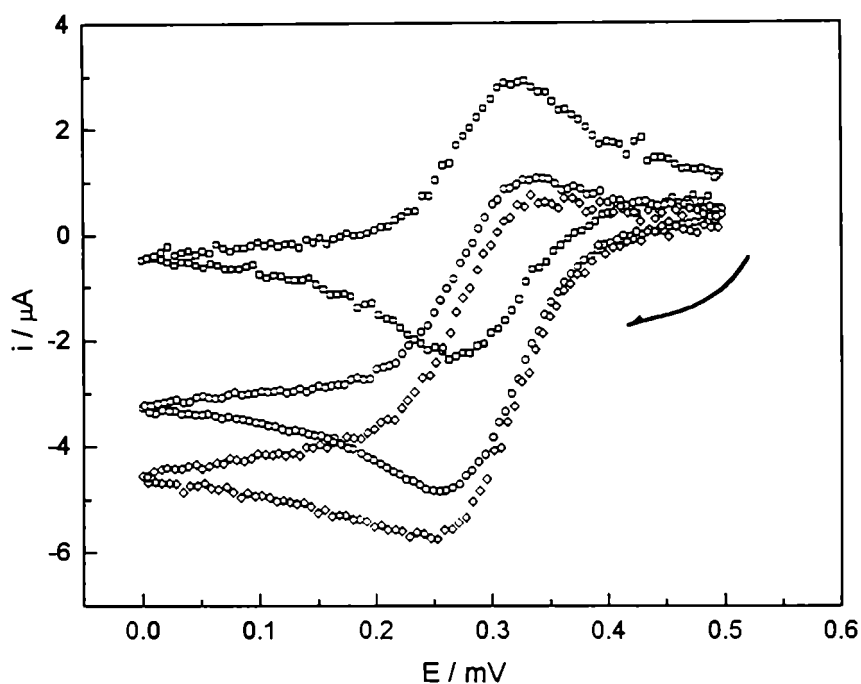


Figura 7.4. Electrodo bienzimático bicapa HRP / LOx, "bienzimático 3".  $v = 5 \text{ mV / seg}$ , en batch sin agitación, temperatura ambiente. En solución tampón, (□) sin L-lactato, (○) 0,7 mM L-lactato; (◊) 1,4 mM de L-lactato.

### 7.3.1. Respuesta al L-lactato en batch

Con el objeto de conocer el ámbito de linealidad de estos electrodos ("bienzimático 3"), y su respuesta al mantenerlos polarizados a 0 mV vs. ECS, se agregaron alícuotas de una solución madre concentrada de L-lactato, en batch ( $V = 50 \text{ ml}$ ).

Los resultados obtenidos (figura 7.5.) muestran que su respuesta es lineal hasta  $450 \mu\text{M}$  de lactato, con una pendiente de  $8,7 \mu\text{A / mM}$  y un coeficiente de correlación  $r^2 = 0,991$ .

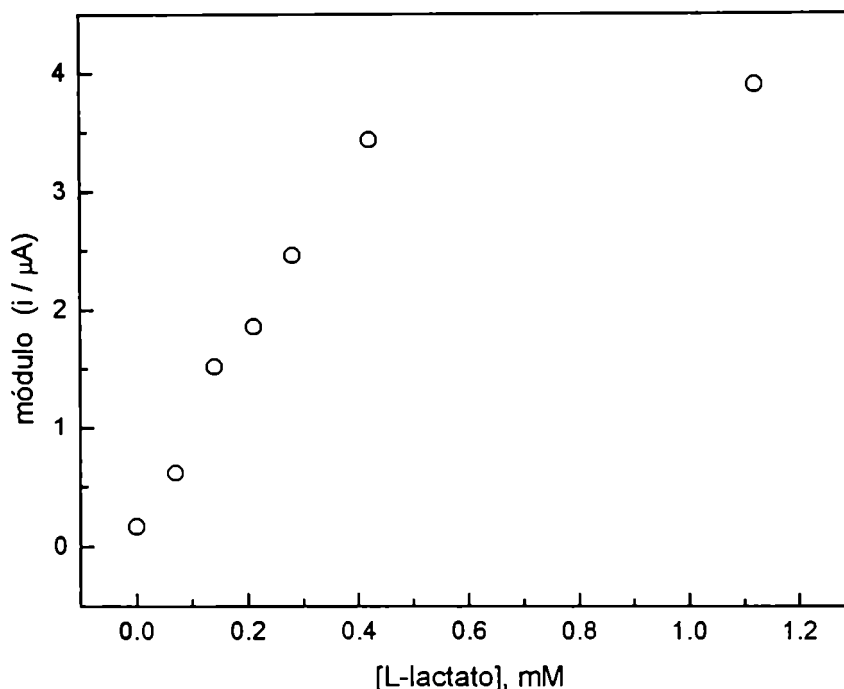


Figura 7.5. Respuesta del electrodo bienzimático bicapa con una composición descrita en la tabla 3.2 ("bienzimático 3"). Se agrego L-lactato a una solución tampón ( $V = 50$  ml) en batch agitado. Se utilizó el módulo de la corriente debido a que estas son catódicas, y convencionalmente reciben el signo negativo.

### 7.3.2. Estudios de reproducibilidad y rango de linealidad en el sistema FIA.

Se utilizó una celda de tipo wall-jet, descrita en materiales y métodos. Como electrodo de referencia se utilizó ECS. El carrier fue tampón fosfatos 50 mM, pH = 7,0 y 0,1 molar en KCl. El loop de inyección tiene un volumen de 70  $\mu\text{L}$  y la velocidad de flujo es de 1,5 ml / min. Los ensayos se realizaron inyectando patrones de lactato preparados en solución carrier. La figura 7.6 muestra los resultados obtenidos en una calibración típica; se realizaron las curvas de regresión, que muestran que el sistema responde linealmente hasta 1 mM de lactato, con un límite de detección de

25  $\mu\text{M}$ . Los coeficientes de correlación en estos ámbitos de concentración son muy buenos, típicamente  $r^2 = 0,997$ .

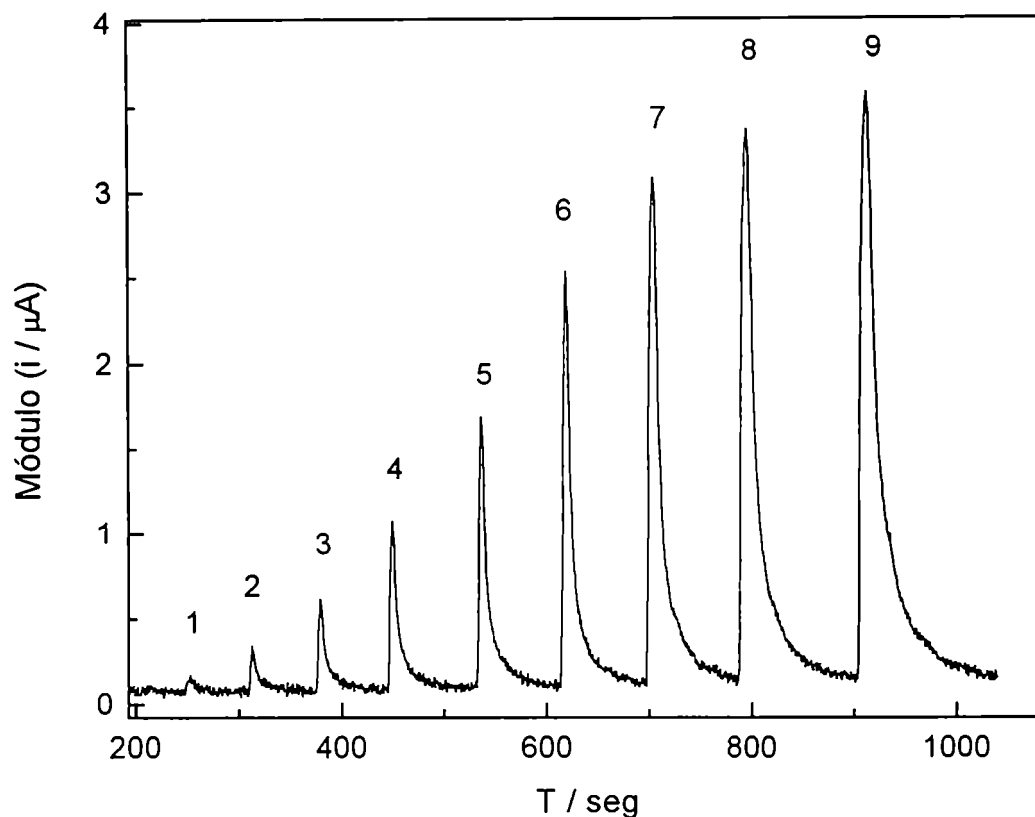


Figura 7.6. Calibración utilizando el biosensor bienzimático como detector en el sistema FIA. Los patrones se prepararon a partir de una solución madre 50 mM en L-lactato. Las concentraciones son las siguientes: (1) 25  $\mu\text{M}$ ; (2) 50  $\mu\text{M}$ ; (3) 125  $\mu\text{M}$ ; (4) 250  $\mu\text{M}$ ; (5) 500  $\mu\text{M}$ ; (6) 1 mM; (7) 2,5 mM; (8) 5 mM; (9) 10 mM. Electrodo "bienzimático 3", ver tabla 3.2.

En la figura 7.7 se observa un ensayo de reproducibilidad. Luego de restar la línea de base para cada pico, el análisis reportó los siguientes resultados:  $n = 10$ ,  $\bar{x} = 0,43 \mu\text{A}$ ,  $\sigma(n-1) = 0,01 \mu\text{A}$  es decir, una desviación standard porcentual menor al 3 %.

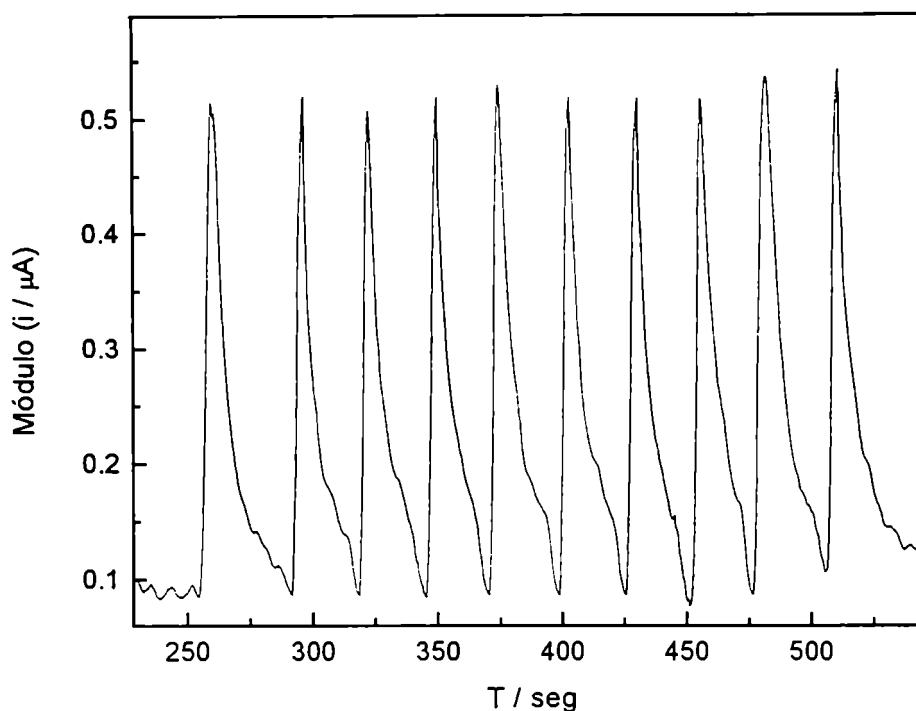


Figura 7.7. Prueba de reproducibilidad en el sistema FIA. Se inyectaron 10 patrones 125  $\mu\text{M}$  de L-lactato. Se utilizó un electrodo de composición "bienzimático 3", tabla 3.2.

### 7.3.3. Estudios de estabilidad en el sistema FIA

Se siguió la evolución de la señal en el tiempo mediante dos métodos; en primer lugar se realizaron curvas de calibración cada 30 / 40 minutos durante 2:30 horas de flujo continuo; se observó que luego de la estabilización del electrodo (30 - 40 minutos), las pendientes de las curvas de calibración ( $\mu\text{A} / \text{mM}$ ) para L-lactato son similares (figura 7.9). En la tabla 7.3 se encuentran los parámetros de las curvas de calibración graficadas en la figura 7.8.

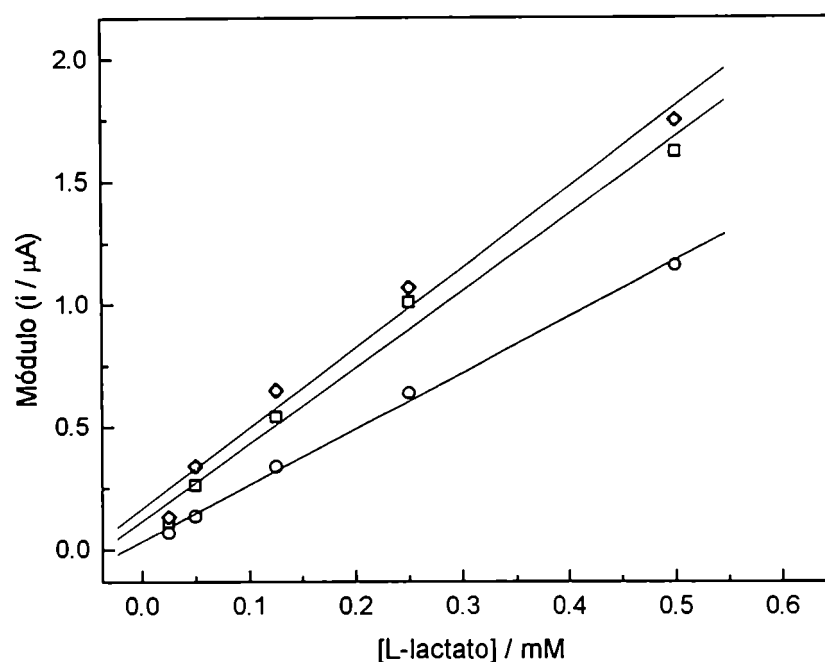


Figura 7.8. Curvas de calibración realizadas a distintos tiempos en el sistema FIA. (○) 5 minutos; (□) 50 minutos; (◇) 150 minutos. Se utilizó un electrodo de composición "bienzimático 3", tabla 3.2.

Tiempo	a (μA)	b (μA / mM)	r <sup>2</sup>
5 minutos	0,033	2,29	0,997
50 minutos	0,11	3,13	0,984
150 minutos	0,16	3,28	0,983

Tabla 7.3. Parámetros de las rectas de regresión correspondientes a la figura 7.8. Modelo lineal,  $y = a + bx$ .

Además, se inyectaron patrones 250 μM aproximadamente cada 10 minutos; los resultados indican una elevada estabilidad en estos electrodos, registrándose solo aumento de la señal al principio de la experiencia como se observa en la figura 7.9.

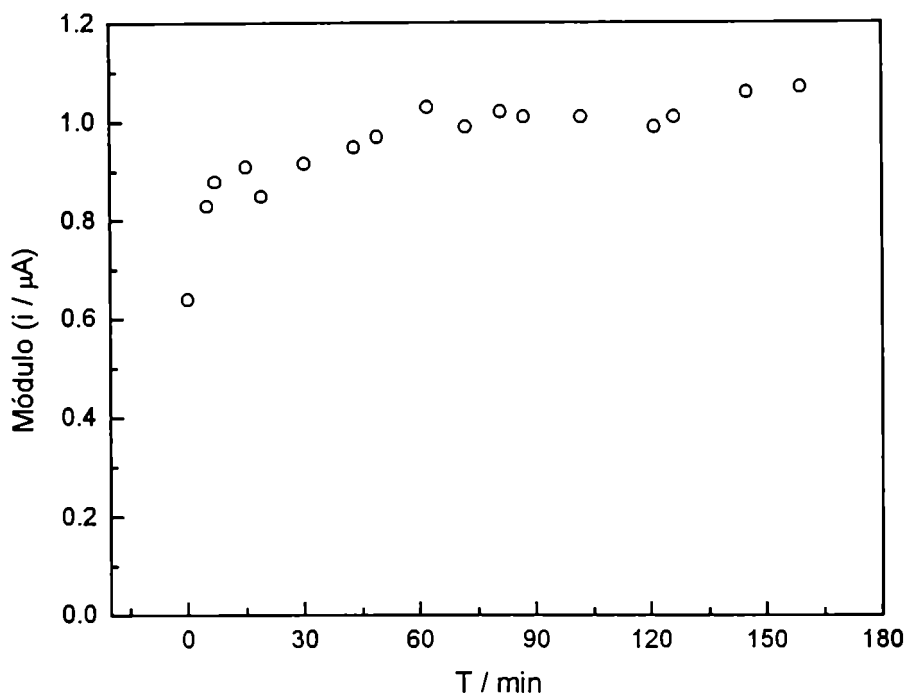


Figura 7.9. Ensayo de estabilidad de los electrodos bienzimáticos usados como detectores en el sistema FIA. Se inyectaron patrones 0,25 mM de L-lactato; se graficó la corriente producida. Se utilizó un electrodo de composición "bienzimático 3", tabla 3.2.

También se constató una disminución de los niveles de ruido del sistema a medida que progresa el estudio de estabilidad. El ruido ( $\Delta i$  pico a pico) de la línea de base fue de 0,1  $\mu A$  al principio del ensayo, disminuyendo a 0,04  $\mu A$  luego de 2,5 horas. Este efecto probablemente es debido a la eliminación de los componentes no polimerizados de la matriz del hidrogel del sensor.

#### 7.3.4. Efecto del medio de leche

Ensayos realizados mediante técnicas de voltametría cíclica muestran que este electrodo también es inhibido en medio de leche. En estos electrodos, bienzimáticos bicapa, es posible ensayar por separado utilizando  $H_2O_2$  o L-lactato la catálisis producida por ambas enzimas. Se estudió el efecto de la leche sobre la capa cableada, formada por peroxidasa / PAAOs y sobre la capa formada por LOx / PAA.

#### 7.3.4.1. Sobre la capa HRP / PAAOs

Se realizaron voltametrías cíclicas para determinar los efectos del medio de leche. En la figura 7.10 se observan voltametrías realizadas en tampón fosfatos, la respuesta de la capa de peroxidasa es la esperada. En la figura 7.11 se comparan voltametrías realizadas en solución tampón y en leche; prácticamente no se observan diferencias entre ambas. Se ensayó la respuesta en solución tampón luego de colocar el electrodo en leche durante 30 minutos, realizando voltametrías cíclicas; no se registró pérdida de corriente, por lo que se concluye que la capa HRP / PAAOs no se ve afectada por este medio.

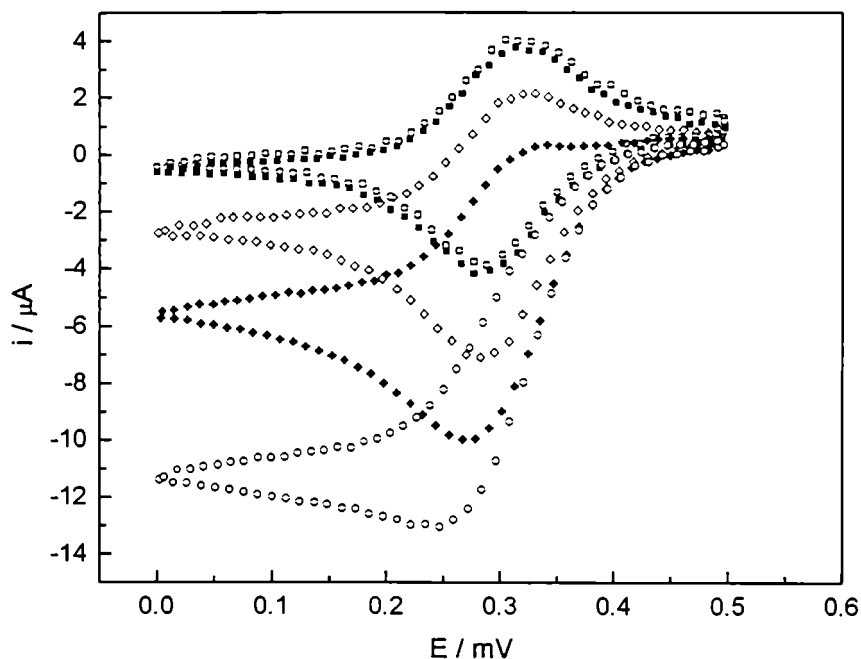


Figura 7.10. Voltametrías realizadas en solución tampón, para distintas concentraciones de peróxido. En batch,  $v = 5 \text{ mV / seg.}$  Sin peróxido ( $\square$ ); peróxido 0,1 mM ( $\blacksquare$ ); 0,6 mM ( $\diamond$ ); 1,1 mM ( $\blacklozenge$ ); 2,8 mM ( $\circ$ ). Se utilizó un electrodo de composición "bienzimático 3", según tabla 3.2.

Esto significa que las capas externas permiten el paso de moléculas pequeñas, como el peróxido, pero impiden el paso o retienen a moléculas grandes,



como las proteínas de la leche; también es posible que la capa HRP / PAAOs, con alto contenido de PEG (respecto a los electrodos GOx - LOx / PAAOs) y por lo tanto una estructura del hidrogel más compacta, dificulte el pasaje de moléculas grandes provenientes de la leche.

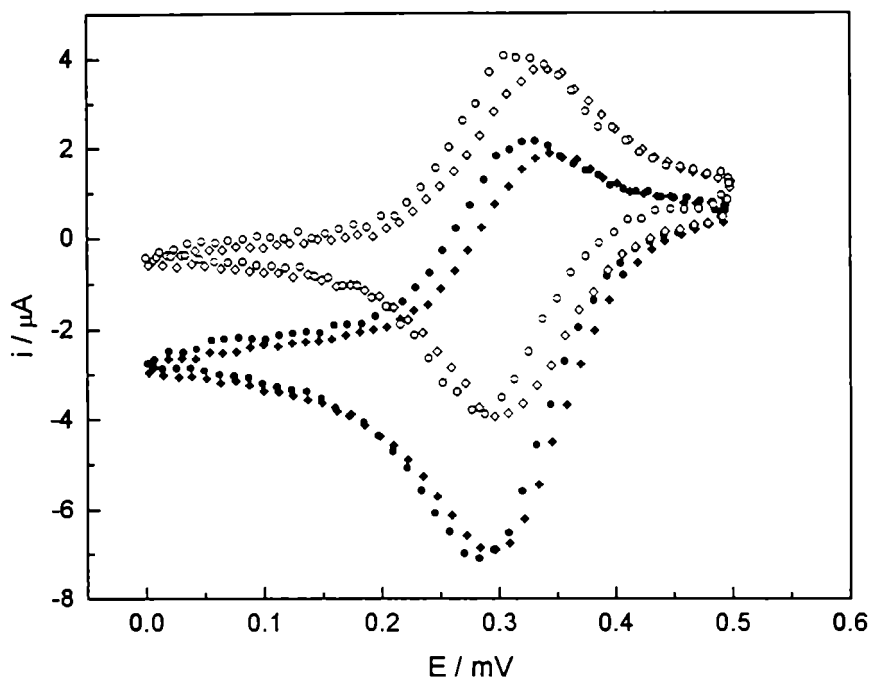


Figura 7.11. Comparación de la respuesta de los electrodos en solución tampón (○) o en leche (◇). Símbolos vacíos, en ausencia de peróxido, símbolos llenos, 600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Voltametrías realizadas en batch,  $v = 5 \text{ mV} / \text{seg}$ .

#### 7.3.4.1. Sobre la capa LOx / PAA

En la figura 7.12 se observa que en presencia de leche, la corriente producida por el electrodo a un potencial de 0 mV vs ECS disminuye sensiblemente. El  $\Delta i$  entre la curva catalítica y la no catalítica a ese potencial es de 4,1  $\mu\text{A}$  en solución tampón y cae a 1,1  $\mu\text{A}$  en medio de leche.

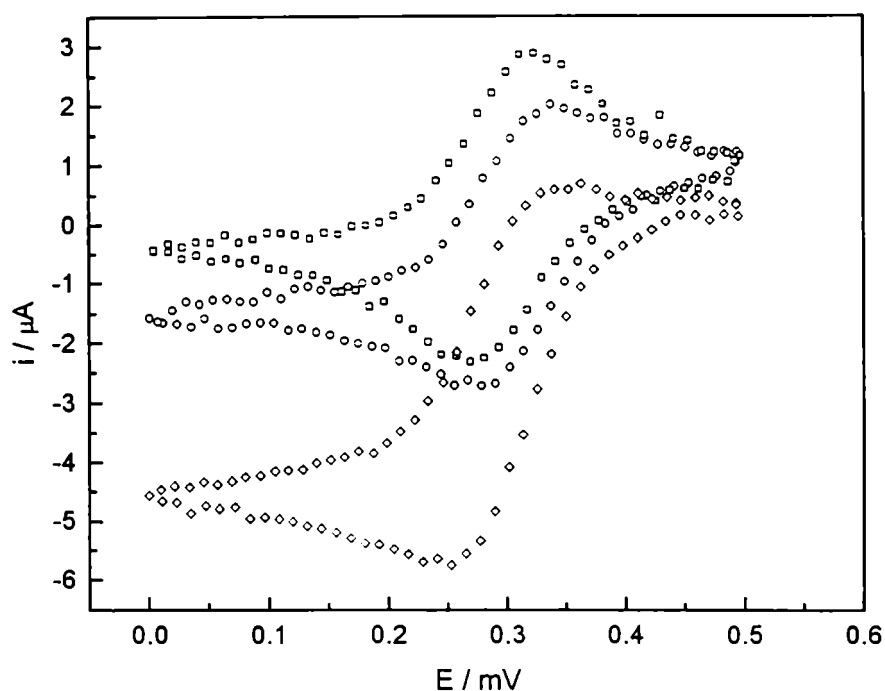


Figura 7.12. Efecto del medio de leche en las corrientes catalíticas. Sin lactato, en solución tampón (□); 1,4 mM en L-lactato en tampón (◊); 1,4 mM en L-lactato en leche (○). Realizadas en batch,  $v = 5 \text{ mV / seg.}$  Se utilizó un electrodo de composición "bienzimático 3", tabla 3.2.

Sin embargo, la inhibición es en parte reversible por lo menos en el corto plazo (15 minutos de exposición al medio de leche), con una pérdida de aproximadamente el 40% de la señal a 0 mV vs ECS, como se observa en la figura 7.13.

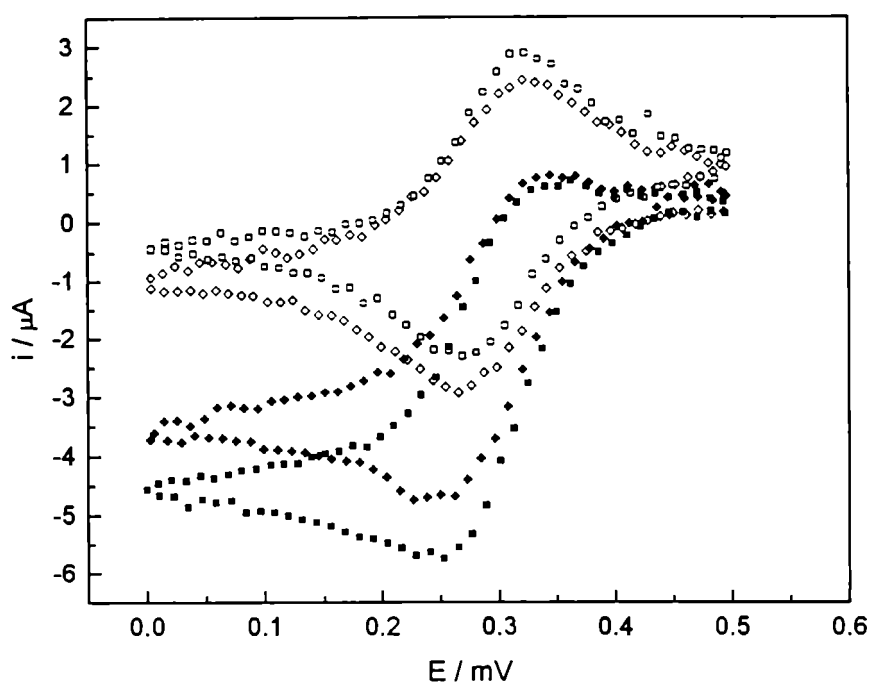


Figura 7.13. Efecto de la leche sobre la recuperación de los electrodos luego de una exposición de 15 minutos en medio de leche. Voltametrías realizadas en tampón, antes de ensayarlos en leche ( $\square$ ) ( $\blacksquare$ ); y después del ensayo ( $\diamond$ ) ( $\blacklozenge$ ); símbolos vacíos en tampón sin L-lactato, símbolos llenos en tampón + L-lactato 1,4 mM. Se utilizó un electrodo de composición "bienzimático 3", tabla 3.2.

Por acidificación a pH 4,6 seguida de centrifugación y posterior ajuste de pH se obtuvo suero de leche. Diluciones del suero 1:20 en solución tampón fosfatos, ensayadas en batch mediante técnicas cronoamperométricas (0 mV vs. Ag/AgCl), no producen disminución de la señal en este electrodo en exposiciones breves (10 minutos); el mismo efecto se observó con diluciones 1:20 de leche. Se ensayó el efecto de membranas de diálisis (corte molecular 12 KD) no obteniéndose efecto protector en medio de leche.

#### **7.4. Ensayos con electrodos bienzimáticos bicapa con elevada concentración de lactato oxidasa**

Se decidió ensayar una elevada concentración de lactato oxidasa, dispuesta en dos capas. La composición de estos electrodos, denominados "bienzimático 4" se observa en la tabla 3.2.

Se realizaron voltametrías cíclicas con el objeto de determinar el efecto de diluciones 1:10 de leche en el comportamiento de estos electrodos. Las voltametrías se realizaron con el electrodo en el sistema FIA, ensayando condiciones más parecidas a las exigidas como detector en el sistema de flujo. Los resultados obtenidos se observan en la figura 7.14. Se utilizó como carrier leche 1:10 durante 20 minutos antes de realizar la segunda voltametría; se observa que no hay efecto sobre las corrientes catalíticas.

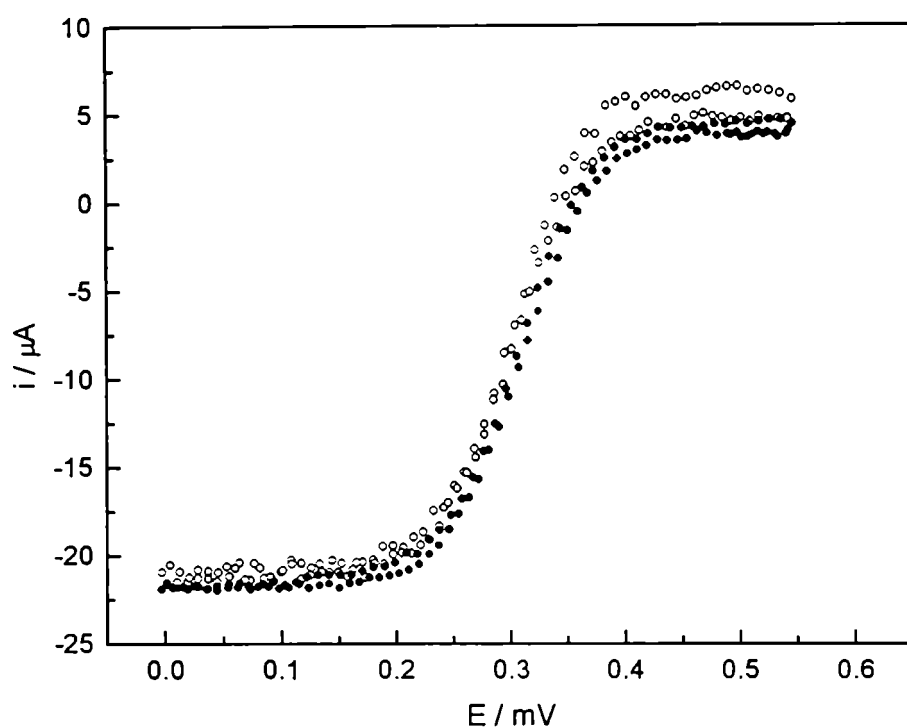


Figura 7.14. Voltametrías en el sistema de flujo, de electrodos bienzimáticos de alta concentración de LOx.  $v = 2 \text{ mV / seg}$ , velocidad de flujo  $1,5 \text{ ml / min}$ . El carrier es solución tampón (□); o leche diluida 1:10 en tampón (■). La concentración de L-lactato es  $2,5 \text{ mM}$  en ambas soluciones carrier. Se utilizó un electrodo de composición "bienzimático 4", tabla 3.2.

#### 7.4.1. Efecto de soluciones de distinta fuerza iónica sobre la velocidad de transferencia electrónica.

Se investigó el efecto de soluciones de distinta fuerza iónica, siguiendo el protocolo establecido en la sección 4.4.6., utilizando las soluciones descritas en la tabla 4.6, reemplazando glucosa por lactato ( $0,125 \text{ mM}$ ), se observaron similares resultados a los discutidos en la sección 4.4.6 de esta Tesis, como se observa en las tablas 7.4 y 7.5.

Secuencia temporal / Nitrato, mM	Epa	Epc	$\Delta E$	ipa	ipc
#1 / 100	274,0	256,1	17,9	1,3	-1,79
#3 / 500	249,8	236,2	13,6	1,26	-2,31
#5 / 1000	250,0	233,0	17,0	1,62	-2,17
#7 / 100	277,0	258,0	19,0	1,17	-1,79

Tabla 7.4. Efecto de soluciones de distinta fuerza iónica en los electrodos bienzimático 4. En solución tampón, sin lactato.

La relación PEG / PAAOs para la capa cableada que contiene peroxidasa, es igual a 3,33. Los resultados que se observan en la ( $\Delta E$ ) son similares a los obtenidos con electrodos GOx cuya relación PEG / PAAOs es igual a 4.

Secuencia temporal / solución utilizada							
#1 / <u>1</u>	#2 / <u>2</u>	#3 / <u>3</u>	#4 / <u>4</u>	#5 / <u>5</u>	#6 / <u>6</u>	#7 / <u>1</u>	#8 / <u>2</u>
-0,47	-3,57	-0,72	-2,65	-0,58	-1,73	-0,53	-3,17

Tabla 7.5. Corrientes ( $\mu A$ ) medidas a  $E = 0$  mV vs. ECS (hemiciclo anódico). Velocidad de barrido 5 mV/seg. En ausencia o presencia de lactato 0,25 mM, distinta fuerza iónica. Los números en **negrita subrayados** corresponden a las soluciones de la tabla 5.4. Electrodos bienzimático 4.

#### 7.4.2. Estabilidad en medios complejos

Se comparó respecto a un electrodo monoenzimático (PAAOs-LOx) la caída de señal, al utilizar ambos biosensores como detectores en el sistema FIA en idénticas condiciones operacionales. Se graficó la caída de señal para patrones de L-lactato 0,5 mM en solución tampón. Sabemos que la caída de señal en nuestros sistemas depende fundamentalmente de la leche; utilizando únicamente patrones en solución tampón la estabilidad tanto para sistemas monoenzimáticos como

bienzimáticos es muy buena, con una caída de señal del orden del 10 % en dos horas de operación. Por ello puede verse en la figura 7.15 que se utilizó el número de muestras lácteas inyectadas en los sistemas, un parámetro mas útil que el tiempo de operación.

Las muestras inyectadas utilizando el electrodo bienzimático HRP / LOx como detector están compuestas por 10 muestras de leche sin diluir, 5 muestras de leche diluida en tampón (1:10) y 5 muestras de yoghurt diluido 1:100. Utilizando el electrodo monoenzimático LOx se inyectaron 20 muestras de leche diluida 1:10 en tampón. Como puede observarse (figura 7.15), la estabilidad del electrodo bienzimático al enfrentarlo a muestras lácteas es muy elevada respecto al monoenzimático, máxime considerando que en el sistema bienzimático se utilizaron muestras de leche menos diluidas, cuyo efecto deletéreo (disminución de la pendiente  $\mu\text{A} / \text{mM}$ ) sobre los electrodos monoenzimáticos es substancialmente mayor.

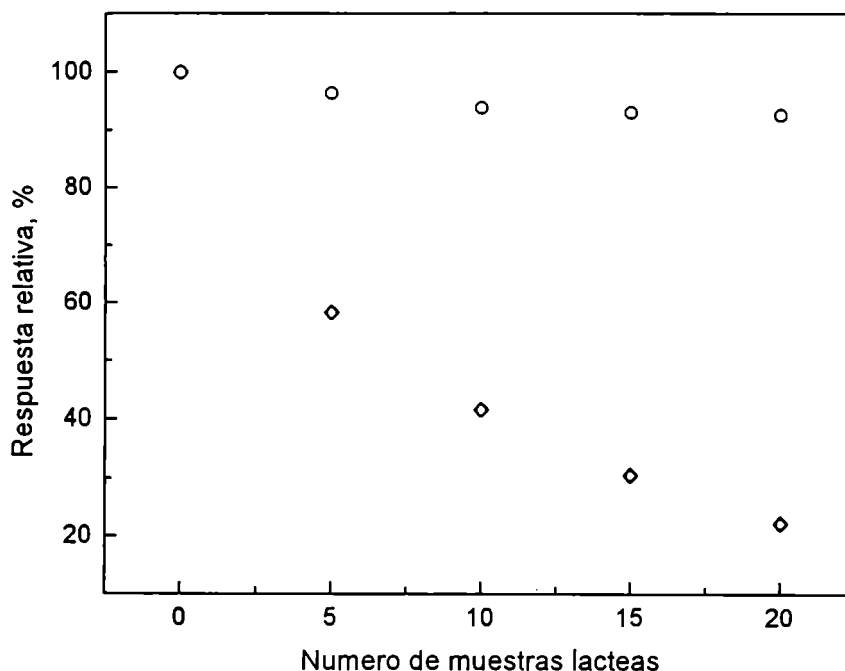


Figura 7.15. Comparación de la estabilidad de los biosensores monoenzimáticos LOx (◇) y bienzimáticos HRP / LOx de composición "bienzimático 4", tabla 3.2. (O) al ser utilizados como detectores en un sistema FIA. Mediante patrones de L-lactato 0,5 mM en solución tampón se cuantificó la pérdida de corriente catalítica.

### 7.5. Medición de L-lactato en muestras lácteas y derivados

Se ensayó el biosensor cuyo desempeño en medios complejos ha sido el más adecuado, cuya composición se estableció en la tabla 3.2. En la figura 7.16 se observan registros típicos, utilizando la celda wall-jet descrita en materiales y métodos, velocidad de flujo de carrier de 1,5 ml / min, a temperatura ambiente. El electrodo se polarizó a 0 mV vs ECS. Es de destacar que se empleó como único tratamiento de las muestras dilución en tampón, de tal manera que su concentración se encuentre dentro del rango lineal de respuesta del biosensor.

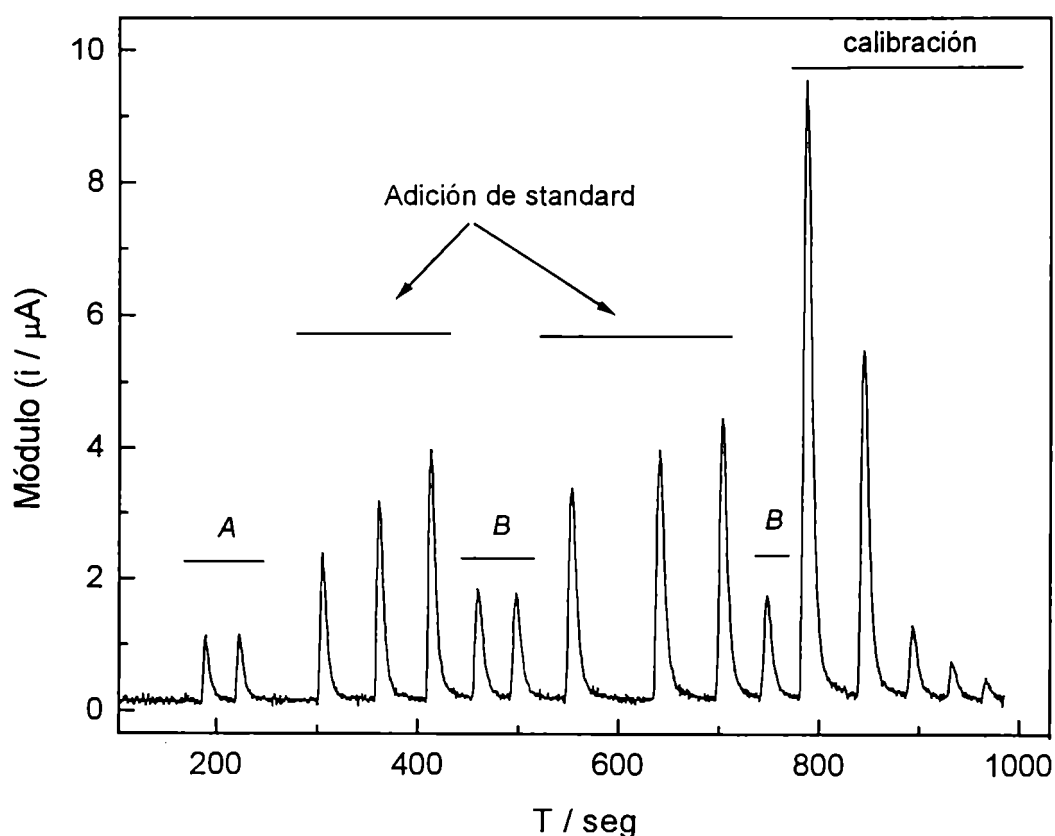


Figura 7.16. Registro típico de la medición de productos lácteos en el sistema FIA, utilizando un electrodo HRP / LOx "bienzimático 4", tabla 3.2. La línea de base es muy estable, y la calibración realizada con patrones de L-Lactato de 20, 50, 100, 500 y 1000  $\mu\text{M}$  presenta un  $r^2 = 0,996$ . *A* yogur dilución 1:1000 en solución tampón; *B* yogur dilución 1:500 en solución tampón.



Utilizando este sistema durante más de dos horas, la pérdida de señal luego de medir más de 50 muestras lácteas y circular como carrier leche durante 30 segundos fue del 8 %. En las mediciones de yogures descremados y enteros, la desviación standard porcentual fue de entre el 1 y el 3% (n = 4)

Los resultados obtenidos utilizando una curva de calibración se validaron utilizando el método de adición de estándar <sup>13 - 14</sup> (figura 7.17). Los resultados obtenidos en la medición de productos lácteos fermentados se observan en la tabla 7.6 son similares a los registrados en la literatura <sup>3 : 14 -15</sup>; uno de estos autores <sup>3</sup>, utilizando un sistema con dos electrodos de trabajo (el segundo es utilizado como blanco), pretratamiento de las muestras (principalmente remoción de cationes) obtiene para yogur valores de entre 52 mM (dilución 1:16) y 71 mM (dilución 1:160), y valores por métodos espectrofotométricos estándar de 78 mM de L-lactato. Otro autor <sup>14</sup> utilizando diluciones (entre 1:150 y 1:500) como único tratamiento de las muestras, obtiene valores de 80,5 mM y de 116 mM para yogur y yogur envejecido (2 semanas, 5 °C) respectivamente. Este mismo autor en otra publicación <sup>15</sup> valora la concentración de lactato en dos tipos de yogures (ambos "plain") obteniendo como resultado 61 mM en uno de ellos y 81,5 mM en el otro.

En la tabla 7.6 se registran los resultados obtenidos por nosotros, el yogur descremado es saborizado y edulcorado, el yogur entero no declara aditivos.

Producto	Dilución	L-lactato, mM (A)	L-lactato, mM (B)
Yogur descremado	1:500	77,2 (2 %)	88,5 (1 %)
	1:1000	94,0 (1 %)	88,0 (1 %)
Yogur entero	1:500	59,1 (3 %)	79,0 (1 %)
	1:750	58,5 (2 %)	80,6 (2 %)
	1:1000	64,5 (1 %)	ND

Tabla 7.6. Resultados obtenidos en la medición de L-lactato en productos lácteos fermentados. (A) Estimados utilizando una curva de calibración, realizada con patrones de L-lactato en tampón. (B) Estimados por el método de adición de standard. Entre paréntesis la desviación standard porcentual. ND no determinado. Se utilizó un electrodo "bienzimático 4", tabla 3.2

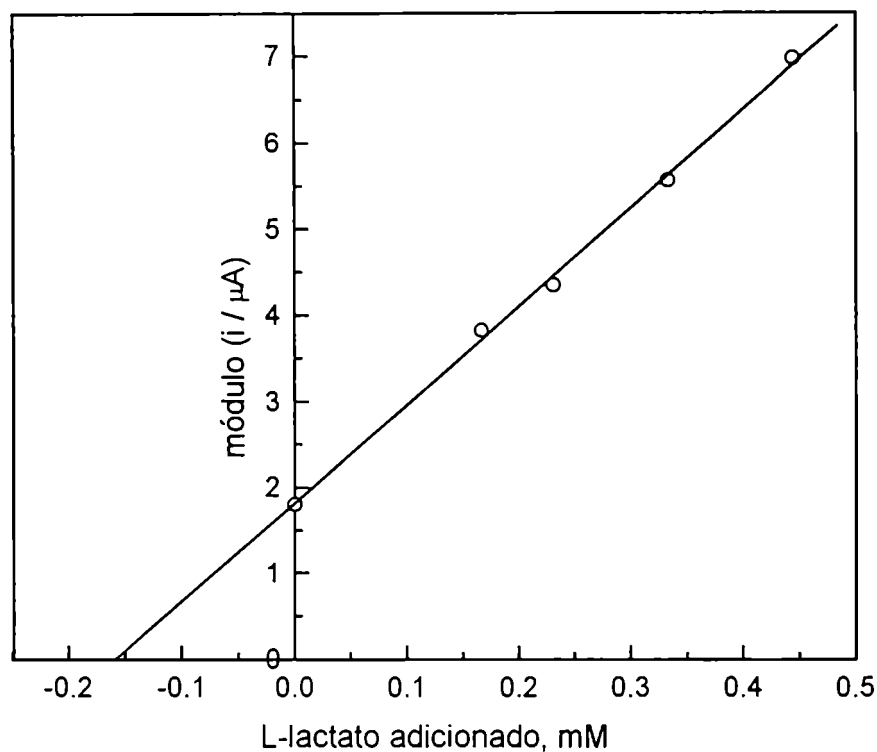


Figura 7.17. Método de adición de standard. Se midió un yogur entero en dilución 1:500 en solución tampón, y se adicionaron distintos volúmenes de una solución patrón 1 mM de L-lactato. El  $r^2$  de la recta de regresión es de 0,998. El valor calculado para la muestra es de 78 mM.

Se siguió la fermentación láctica de un medio preparado a base de leche en polvo reconstituida, inoculada con un starter comercial (inoculo 1:100), incubación a 37 °C. Se retiraron muestras de 1 ml cada 15 minutos. Los datos obtenidos se observan en la figura 7.18. Las muestras se midieron en dilución 1:1 en las etapas tempranas de la fermentación y en diluciones de hasta 1:50 en las etapas tardías.

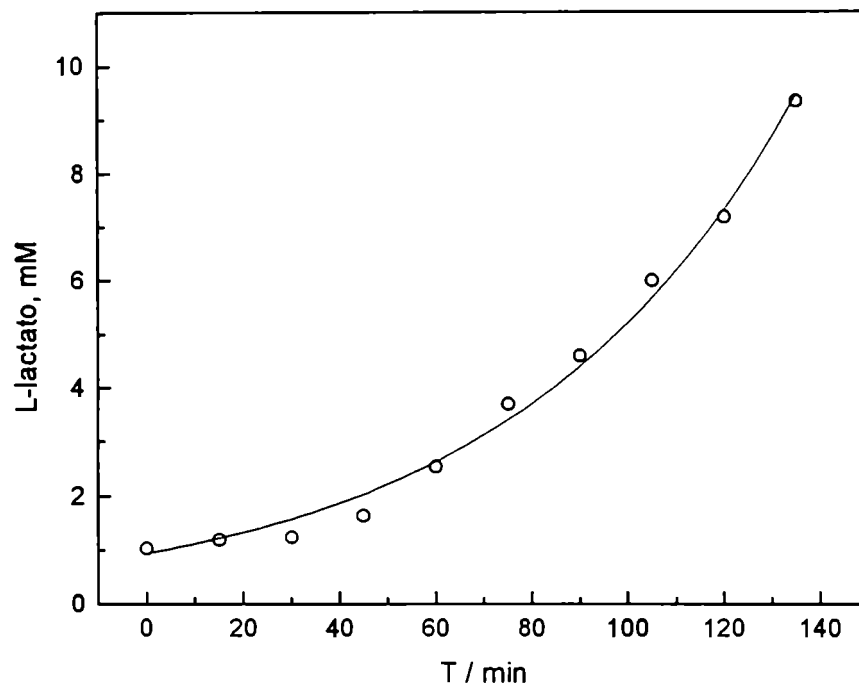


Figura 7.18. Fermentación láctica en medio de leche. Se utilizó un inóculo 1:100.

Se graficó en la figura 7.19 la relación entre la concentración de L-lactato calculadas utilizando el biosensor y la concentración de protones calculada a partir de los valores de pH registrados utilizando un electrodo combinado de pH.

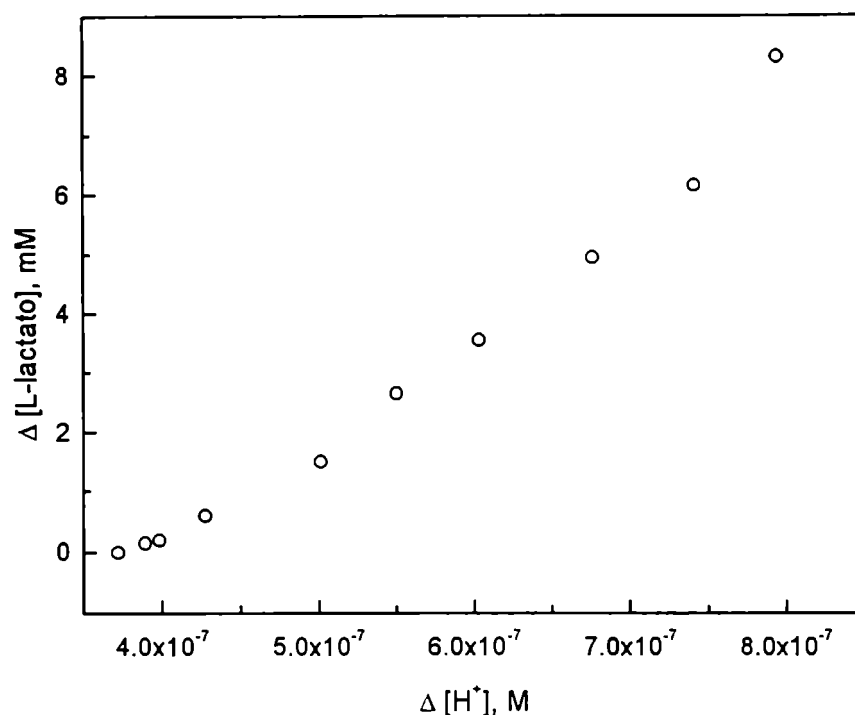


Figura 7.19. Relación entre la producción de L-lactato y la actividad de protones en el medio de incubación.

Se utilizó el sensor para medir la concentración de L-lactato en muestras de leche sin diluir. Los resultados obtenidos se registran en la tabla 7.7. Los valores promedio o "normales" (la concentración es muy variable dependiendo fundamentalmente de las condiciones de ordeño, las condiciones de transporte y almacenaje, entre otras) para leche <sup>16</sup>. esta en el rango de 34-104 mg / l de ácido láctico total. Mediciones realizadas mediante técnicas similares a las nuestras <sup>15</sup> informan valores de 2,8 mM (256 mg / l).

Producto	L-lactato, mM (A)	L-lactato, mM (B)
Leche descremada reconstituida	110 $\mu$ M (5 %)	152 (2 %)
Leche descremada fresca	64 $\mu$ M (6 %)	87 $\mu$ M (1 %)

Tabla 7.7. Resultados obtenidos en la medición de L-lactato en leche. (A) Estimados utilizando una curva de calibración, realizada con patrones de L-lactato en tampón. (B) Estimados por el método de adición de standard. Entre paréntesis la desviación standard porcentual ( $n = 3$ ). Muestras sin preparación ni dilución.

En muestras de leche tratadas con EDTA (concentración final 2 %) se provoca la solubilización de las micelas de caseína, y probablemente otros cambios en la matriz analítica por eliminación del calcio y otros iones. Muestras de leche descremada reconstituida tratadas con EDTA, medidas en dilución 1:10 en solución tampón (la dilución es necesaria para que su concentración corresponda al rango lineal de respuesta del sensor, 0 - 0,5 mM L-lactato) han arrojado una concentración de 0,79 mM (68 mg / l), comparable a la concentración medida en leche utilizando métodos enzimáticos estándar.

## 7.6. Referencias

1. Vreeke, M.S.; Heller, A.; *Anal. Chem.* **64** (1992) 3084.
2. Gorton L.; Jonsson G.; Petterson E.; Csoregi E.; Hohanson K.; Dominguez E.; Marko-Varga G.; *Analyst* **117** (1992) 1235.
3. Collier W.A.; Janssen D.; Hart A.L.; *Biosensors & Bioelectronics*, **11** (1996) 1041.
4. Pfeiffer D.; Setz K.; Schulmeister T.; Scheller F.W.; *Biosensors & Bioelectronics*, **7** (1992) 661.
5. Calvo E.J.; Etchenique R.; Danilowicz C.; Diaz L.; *Anal. Chem.* **68** (1996) 4186.
6. Alais C. Ciencia de la leche, Editorial Reverte, Barcelona, 1985.
7. Danilowicz C.; Cortón E.; Battaglini F.; Calvo E.J.; *Electrochimica Acta*, **43**, (1998) 3525.
8. Ohara T.J.; Vreeke M.S.; Battaglini F.; Heller A.; *Electroanalysis* **5** (1993) 825.
9. Kenausis G.; Chen Q.; Heller A.; *Anal. Chem.* **69** (1997) 1054.
10. Zhao J.; Henkens R.W.; Crumbliss A.L.; *Biotechnol. Prog.* **12** (1996) 703.
11. Garguilo M.G.; Huynh N.; Proctor A.; Michael A.C.; *Anal. Chem.* **63** (1993) 523.
12. Ryan O.; Smyth M.R.; Fágáin C.O.; *Essays Biochem.* **28** (1994) 129.
13. Bardeletti G.; Sechaud F.; Coulet P.R.; *Anal. Chim. Acta.* **187** (1986) 47.
14. Hajiazadeh K.; Halsall H.B.; Heineman W.R.; *Anal. Chim. Acta.* **243** (1991) 23.
15. Hajiazadeh K.; Halsall H.B.; Heineman W.R.; *Talanta* **38** (1991) 37.
16. Fundamentals of Dairy Chemistry. Wong N.P. Editor. Van Nostrand Reinhold, New York, 1988.

## 8. RESULTADOS OBTENIDOS CON BACTERIAS LACTICAS

### 8.1. Arreglo instrumental utilizado en los ensayos en FIA

Se utilizó la celda de flujo descrita en la sección 3.3.1., esta celda se utilizó en el arreglo que se observa en la figura 8.1. Antes de llegar el flujo de carrier a la celda, pasa por un espiral ("coil") de unos 60 cm, que permite que el fluido alcance la temperatura del baño termostático.

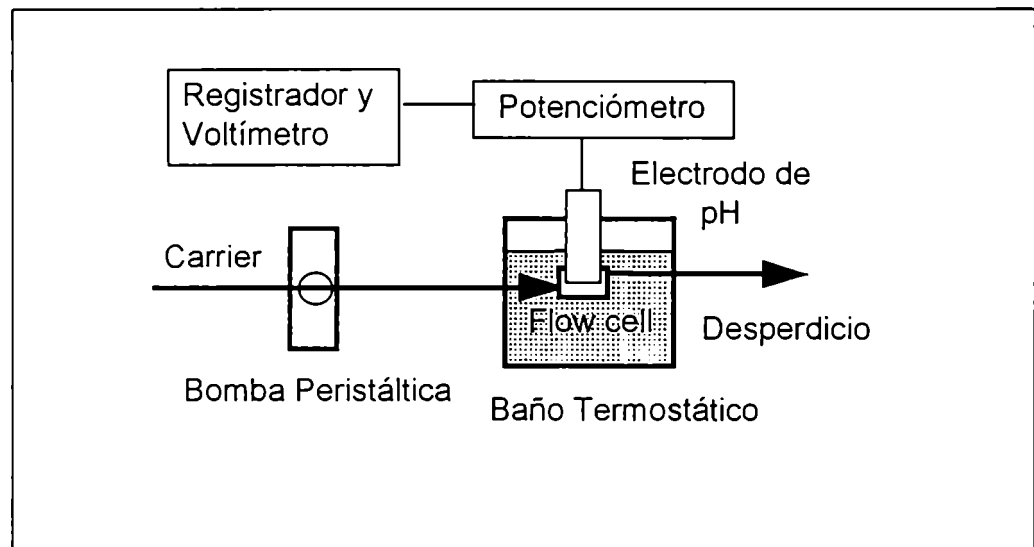


Figura 8.1. Arreglo instrumental utilizado, se observa la dirección de flujo. Todas la tubuladuras son de 1,16 mm (diámetro interno). Partes no en escala.

### 8.2. Evaluación de agar-agar como medio de inmovilización, utilizando *Lactobacillus acidophilus*

Se realizó un cultivo en medio MRS basal. Se agregó como fuente de carbono lactosa 2 % . Se midió absorbancia a 550 nm, peso seco y peso húmedo. 40 ml de este medio (que contienen 610 mg de células, peso húmedo) se centrifugaron, se resuspendió el pelet en 1 ml de MRS basal.

Se dividió el resuspendido en dos alícuotas del mismo volumen, y se mezclaron con 9,5 ml de una solución de agar en MRS (1,5 % y 0,75% agar-agar), a una temperatura aproximada de 50 °C, y se colocó en una cápsula de Petri hasta fraguado. Se obtuvieron de esta manera células inmovilizadas en agar-agar, formando láminas de aproximadamente 2 mm de espesor. Estas se cortaron en trozos de 1 cm<sup>2</sup>, y se sometieron a ensayos de cinética, registrándose cambio de pH en el tiempo, en medio MRS mas lactosa 2% y en medio de leche.

La concentración de bacterias utilizada es de aproximadamente 30 mg / ml de gel, concentraciones similares han sido utilizadas por otros autores<sup>3</sup>.

En cada ensayo se utilizaron 3 gr de de las células inmovilizadas en agar, en un volumen de 5 ml de los medios indicados.

Los resultados (figura 8.2.) indican que la fermentación es más rápida en medio de leche que en medio MRS, y que no es importante la concentración de agar para la producción y liberación de ácido láctico, en las concentraciones utilizadas.

Se ensayaron concentraciones menores de células, aproximadamente 4 mg / ml de gel, observándose variaciones de pH en el tiempo menores (15 % respecto a los geles que contienen 30 mg / ml).



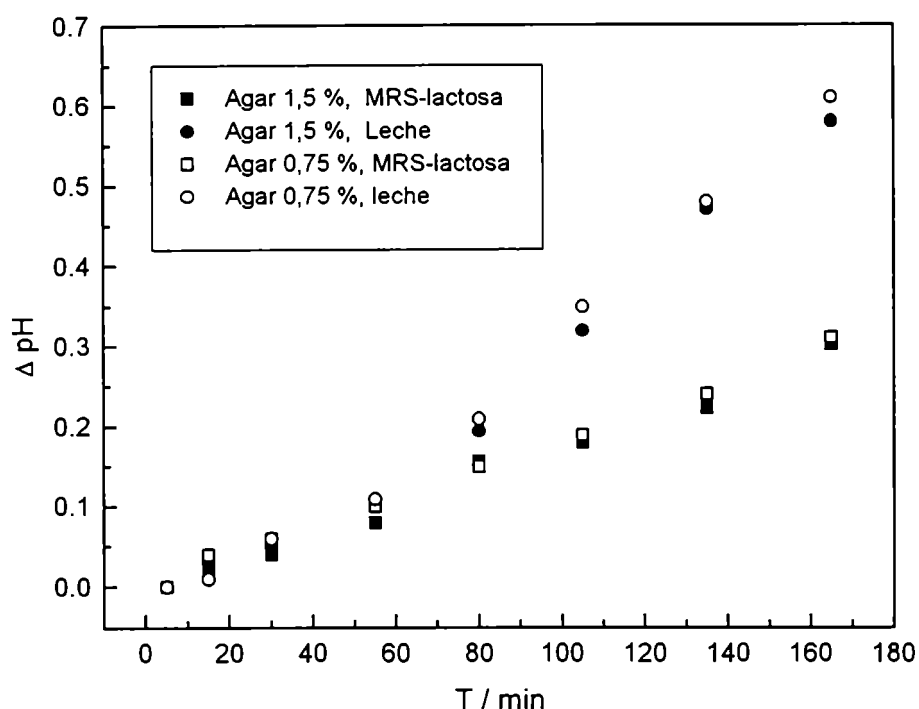


Figura 8.2. Cambio de pH producido por *Lactobacillus acidophilus* inmovilizado en geles de agar. La incubación se realizó a 37°C. MRS basal + lactosa (2 % p / v). Las diferencias en las pendientes ( $\Delta\text{pH} / \Delta t$ ) entre duplicados (datos no graficados) fue menor al 10 %.

El procedimiento de inmovilización en agar-agar no resultó adecuado por los siguientes motivos; en primer lugar, el efecto producido por el shock térmico recibido por las células, sumado a la dificultad para controlar exactamente la temperatura del agar, provocó que en algunos eventos de inmovilización la capacidad fermentativa de las células se viera negativamente afectada; en segundo lugar, el estudio de la viabilidad de las células inmovilizadas luego de los ensayos de fermentabilidad y durante el almacenado en frío (congelamiento seguido de triturado del gel en mortero<sup>3</sup>) resulta poco adecuado e involucra importantes errores en las determinaciones.

Se decidió utilizar otro *Lactobacillus*, ya que *Lb. acidophilus* produce LD-lactato, mientras que los biosensores enzimáticos desarrollados son sensibles específicamente al L-lactato.

### 8.3. Optimización del método de inmovilización y ensayos preliminares utilizando la cepa Y3

Se utilizó un método de inmovilización utilizando alginato de calcio, protocolo ya descrito <sup>4</sup> para la inmovilización de otras LABs (*Lactobacillus helveticus*). Luego de concentrar células Y3 por centrifugación, se resuspendieron en 1ml de medio MRS sin fuente de carbono, y se mezcló con 1 ml de una solución de alginato de Na<sup>+</sup> (4%). Esta solución fue depositada por goteo sobre un baño coagulante sometido a agitación continua, conteniendo cloruro de sodio (200 mM) y cloruro de calcio (50 mM).

Luego de 30 minutos, para que la gelificación progrese en todo el volumen de las gotas, se obtuvieron cuentas ("beads") de tamaño uniforme. El peso húmedo de estas fue de  $9,7 \pm 0,6$  mg, el peso seco de  $0,6 \pm 0,1$  mg y un diámetro de  $2,9 \pm 0,2$  mm; estos resultados son similares a los reportados <sup>4</sup>.

Las células inmovilizadas se utilizaron en algunos experimentos preliminares, constatándose que el procedimiento no afectaba la capacidad fermentativa de las células, y mantenían su viabilidad. En la figura 8.3 puede observarse similares velocidades de fermentación en células inmovilizadas y libres.

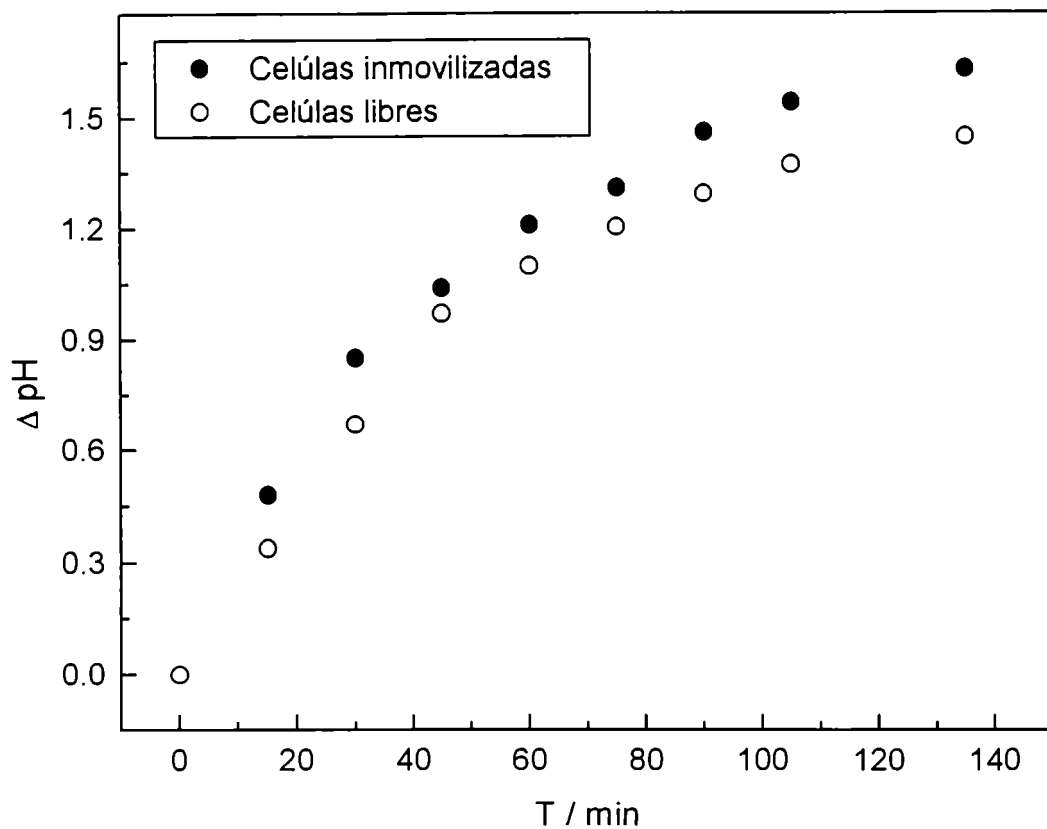


Figura 8.3. Ensayo de fermentación en medio MRS basal + lactosa (2 %), estático en batch, utilizando células (cepa Y3) inmovilizadas en alginato de  $\text{Ca}^{++}$  y libres.

El desarrollo de un método para la caracterización LABs especies requería que la difusión de las fuentes de carbono a ensayar y el lactato producido por la células inmovilizadas fuera lo más rápido posible. El comportamiento de transferencia de masa dentro del gel es descrito por el número adimensional de Damkohler <sup>5</sup>.

$$Da = \frac{k_2 r^2}{D_e K_s}$$

Como puede verse, el número de Damkohler ( $Da$ ) el radio de la partícula ( $r$ ) afecta de manera importante (al estar elevado al cuadrado) el comportamiento de los

solutos, modulando el valor del coeficiente de difusión efectiva ( $D_e$ ,  $m^2 / seg$ ) que depende principalmente del tamaño del soluto.

Se realizaron entonces modificaciones al protocolo de inmovilización con el objeto de conseguir cuentas de gel de menor tamaño. Las variaciones que se introdujeron al método fueron básicamente dos. En primer lugar, se resuspendió a las células en solución salina isotónica, reemplazando al MRS basal; los cationes bivalentes de este medio provocan un aumento de la viscosidad del alginato de sodio, por lo que las gotas producidas son de mayor tamaño; en segundo lugar, se disminuyó la concentración de alginato a la mitad, con una concentración final del 1 %. En estas condiciones, se obtuvieron cuentas de un diámetro de  $1,7 \pm 0,2$  mm y un peso húmedo de  $2,2 \pm 0,3$  mg ( $n = 10$ ).

Una ventaja inherente a este método de inmovilización, respecto al gel de agar, es que el alginato de calcio es desestabilizado por agentes quelantes (EDTA, citrato de Na, buffer fosfatos), por lo que el conteo de células (ufc) es sencillo. Para disolver las cuentas se seleccionó por su rapidez una solución de EDTA al 2 %.

#### **8.3.1. Ensayos preliminares en el sistema FIA**

Se colocaron cuentas de células de la cepa Y3 inmovilizadas en alginato de calcio, según lo esquematizado en la figura 3.2. Se colocaron  $2\text{ cm}^3$  de cuentas en la celda de flujo, cuyo volumen total es de aproximadamente 4 ml. Se utilizó como carrier medio MRS basal adicionando con calcio, y con 2 g / l de lactosa. Se observó que la acidificación era importante, y se ensayó la reproducibilidad en la disminución de pH al interrumpir el flujo de carrier.

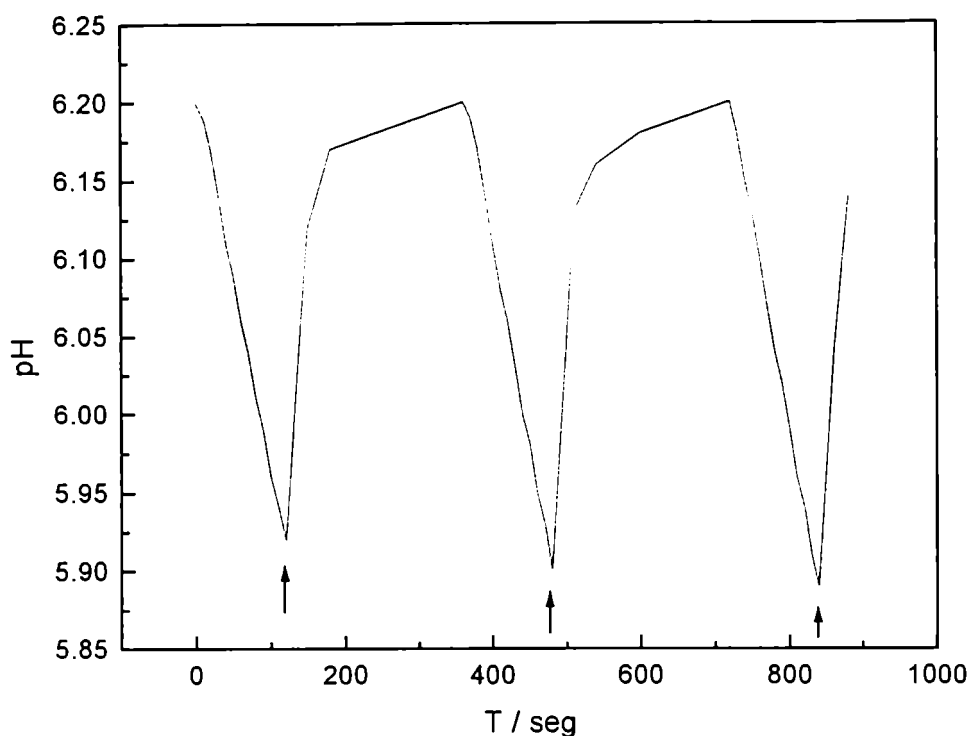


Figura 8.4. Efecto de la interrupción del flujo de carrier, reproducibilidad, en medio MRS más calcio. Las flechas indican el encendido de la bomba peristáltica (flujo = 2 ml / min), el pH deriva rápidamente hacia el pH de la solución carrier (pH = 6,5).

Luego de optimizar el método de inmovilización, los resultados obtenidos indicaban que era importante, para obtener resultados reproducibles, estandarizar y estudiar los siguientes ítems.

- 1) La composición del carrier. Se observó que en soluciones carrier sin extracto de levadura, las respuestas eran débiles, disminuyendo rápidamente en el tiempo la capacidad fermentativa de las células inmovilizadas. En una hora de flujo en el FIA la señal caía al 30%. Si la solución carrier utilizada era un medio complejo, el cambio de pH producido sin adicionar fuentes de carbono era importante (señal de base alta).
- 2) La fuente de carbono utilizada en el medio de crecimiento basado en MRS basal, estudios preliminares indican que células crecidas utilizando glucosa como fuente de carbono son poco sensibles a otras fuentes de carbono (efecto represión catabólica).
- 3) La viabilidad de las células inmovilizadas durante el almacenado en frío y durante el tiempo de los ensayos en el sistema FIA

- 4) La concentración de células en el alginato de calcio. Concentraciones de 200 mg (peso húmedo) / ml gel producen importantes cambios de pH (figura 5.8 y tabla 1.8), mientras que concentraciones de 30 mg / ml producen variaciones de pH menores al 20 %.
- 5) El orden en el que las fuentes de carbono a ensayar son inyectadas en el sistema de flujo.
- 6) Los tiempos entre muestras y el tiempo inicial de hambreado de las células.
- 7) El tiempo mínimo necesario para obtener la información requerida.

#### **8.4. Resultados obtenidos utilizando *Lactobacillus casei*, ATCC 393**

##### **8.4.1 Optimización de las soluciones carrier para los ensayos en FIA**

De la manera habitual se inmovilizaron células ATCC 393, se colocaron en la celda de flujo y se circularon distintas soluciones carrier, de tal manera de seleccionar aquella en la que la respuesta fuera máxima. Ensayos realizados en buffer, solución salina, o buffer mas solución salina, empleados por otros autores <sup>6-7</sup> utilizando como material biológico levaduras, no aseguran el mantenimiento de la viabilidad y capacidad fermentativa en LABs, mucho más exigentes nutricionalmente. Los resultados obtenidos se resumen en la figura 8.5.

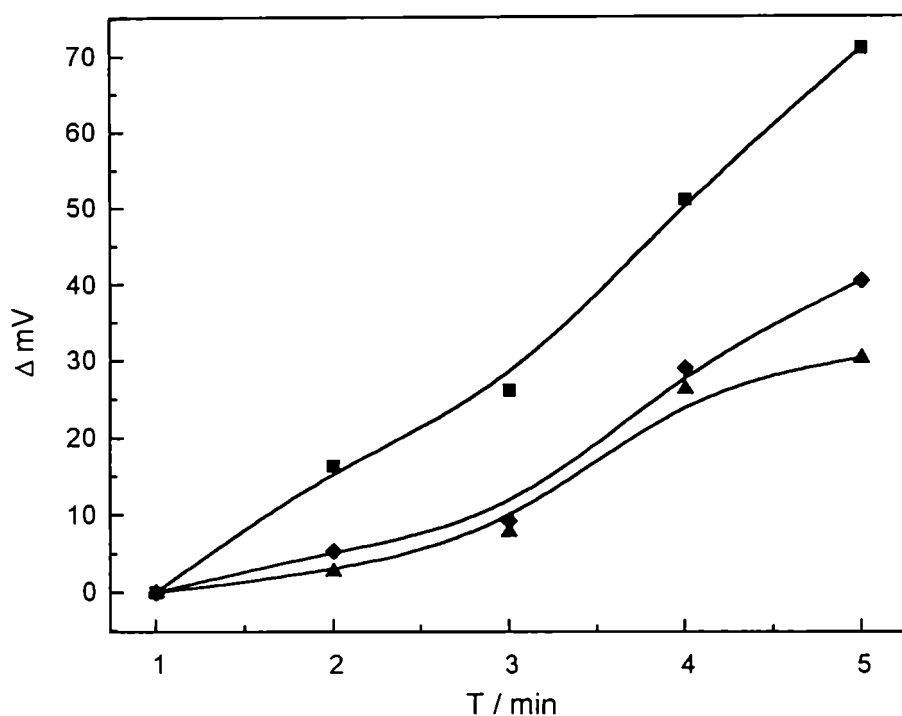


Figura 8.5. Evaluación de distintas soluciones carrier. (■) 5 mM Bis-Tris buffer pH = 6,5 (◆) 8,5 g / l NaCl y (▲) MRS basal. Todas contienen 10 mM / l de glucosa, 0,5 g / l de CaCl y 0,1 % p / v de extracto de levadura. Se restó en todos los casos los  $\Delta mV$  producidos en la celda de flujo por la solución carrier correspondiente (sin glucosa), considerado como la línea de base. En el caso de medio MRS basal, la línea de base fue la más elevada.

Se utilizó entonces, 5 mM Bis-Tris buffer pH = 6,5; 0,5 g / l de CaCl y 0,1 % p / v de extracto de levadura como solución carrier, y solución base en la que se preparan las fuentes de carbono que se ensayan en el sistema FIA en todas la experiencias descritas en el resto de este capítulo. La concentración de Bis-Tris utilizada otorga a las soluciones mínima capacidad buffer, permitiendo amplias variaciones de pH al modificarse la concentración de ácido láctico en el medio. En otros diseños experimentales utilizando biosensores híbridos y monitoreo del cambio de pH en sistemas de inyección en flujo <sup>8</sup>, concentraciones aún más bajas han sido utilizadas (2 mM).

#### 8.4.2. Optimización de las concentraciones de fuentes de carbono

Un aspecto analizado fue el tiempo de hambreado, tiempo necesario entre fuentes de carbono para que la fuente de carbono se agotara dentro de las cuentas alginato, de tal manera de que su influencia sobre la fuente de carbono siguiente fuera mínima. Esto se estudió registrando  $\Delta mV$ , en solución carrier sin agregado de fuente de carbono. Se encontró que estos tiempos estaban relacionados con la concentración de las fuentes de carbono en las soluciones, por lo que se estudió el efecto de sus concentraciones. La figura 8.6 muestra los resultados obtenidos, en los que la saturación (máxima velocidad de acidificación) se alcanza con valores de 10 mM de glucosa. Experiencias similares realizadas con fructosa arrojaron similares datos, por lo que se selecciono esa concentración para los ensayos. En la figura 8.7 se observa la cinética de saturación para glucosa.

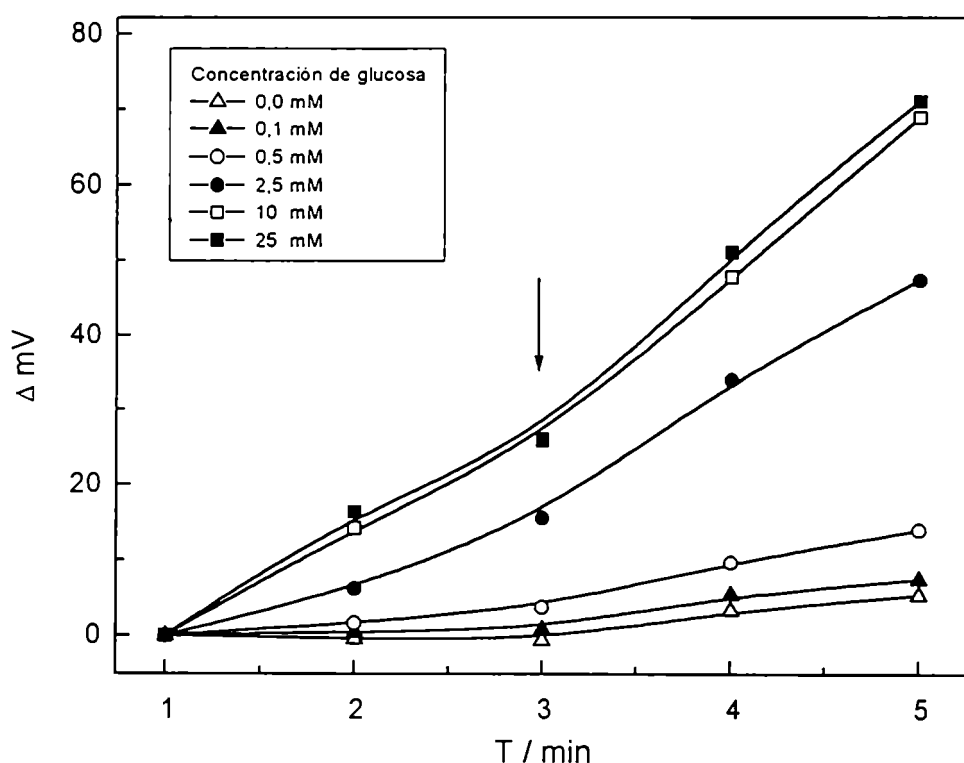


Figura 8.6. Se utilizaron distintas concentraciones de glucosa. (0; 0,1; 0,5; 2,5; 10 y 25 mM). La flecha indica el momento en que se detiene el flujo de carrier.



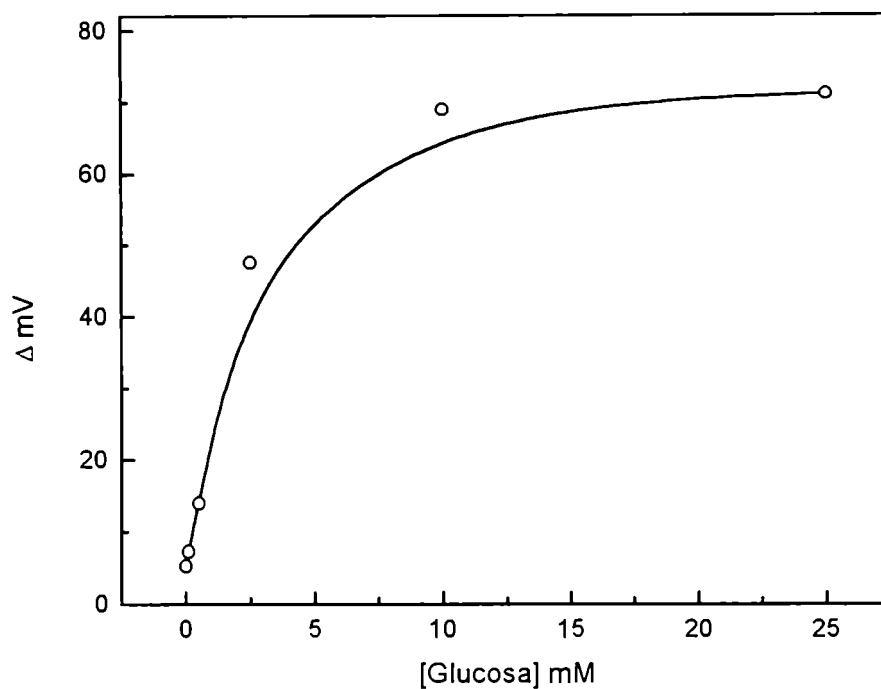


Figura 8.7. Se grafican los datos obtenidos en la figura 8.6, a  $t = 5$  minutos. Se observa una cinética del tipo Michaeliana.

#### 8.4.3. Viabilidad de las células inmovilizadas

Se estudió la viabilidad de las células inmovilizadas en alginato de calcio, con el objeto de estudiar la posibilidad de almacenarlas en frío. Los datos obtenidos (tabla 8.1.) demuestran escasa pérdida de viabilidad en el periodo de tiempo empleado, y no se observó duplicación de las células inmovilizadas; resultados similares fueron encontrados <sup>4</sup> utilizando *Lactobacillus helveticus*.

Fuente	Conteo en placa (cfu / ml)
Cultivo original <sup>a</sup>	4,5 x 10 <sup>9</sup>
Inmovilizadas	
Inicial <sup>b</sup>	3,2 x 10 <sup>10</sup>
Antes de los ensayos <sup>c</sup>	3,9 x 10 <sup>10</sup>
Después de los ensayos <sup>d</sup>	4,3 x 10 <sup>10</sup>
Almacenadas en frío <sup>e</sup>	4,6 x 10 <sup>10</sup>
Después de recuperación <sup>f</sup>	7,7 x 10 <sup>10</sup>

Tabla 8.1. Viabilidad de células inmovilizadas de *Lactobacillus casei*. Se cultivaron en MRS-lactosa y fueron inmovilizadas en alginato de calcio. Las cuentas ("beads") se disolvieron en 1 ml 2% EDTA y se diluyeron para el conteo en placa. <sup>a</sup> Cultivo de 18 horas a 37 °C, D.O. (550 nm) = 3. <sup>b</sup> Concentradas 20 veces. <sup>c</sup> Luego de una incubación de 16 horas a 28 °C en MRS-lactosa. <sup>d</sup> Luego del ensayo en FIA (2,5 Hs 37°C). <sup>e</sup> Luego de permanecer 20 días a 4°C. <sup>f</sup> Luego de incubación de 16 hs. a 28 °C en MRS-lactosa.

#### 8.4.4. Optimización de las condiciones de ensayo

Los aspectos referidos a las técnicas de inmovilización, solución carrier, concentración de las fuentes de carbono a ensayar y viabilidad ya han sido tratadas. Otros aspectos a considerar han sido el orden en el que las fuentes de carbono a ensayar son inyectadas en el sistema de flujo; hemos empleado el siguiente orden, en primer lugar trisacáridos, seguidos de disacáridos, alcoholes, pentosas y monosacáridos. Este orden es debido a que observamos una importante disminución en el grado de acidificación (desarrollada por otras fuentes de carbono) cuando glucosa es inyectada en el sistema FIA antes que los disacaridos.

La represión catabólica producida por monosacáridos ha sido disminuida utilizando tiempos de medición pequeños (máximo 5 minutos) para aquellas fuentes de carbono que provocan cambios de pH importantes. El protocolo de medición optimizado resultó ser el siguiente:

- 1) Se colocan 2 ml de células inmovilizadas en la celda de flujo (volumen total 4 cm<sup>3</sup>).

Si estas células han sido almacenadas en frío (5 °C), se permite su recuperación durante 2 horas a 37 °C utilizando como carrier MRS basal más la fuente de carbono correspondiente a la condición de precrecimiento ( $V = 0,3 \text{ ml / min}$ ).

2) Se circula Buffer bis-tris (adicionado con  $\text{Ca}^{++}$  y extracto de levadura) durante 1 hora ( $V = 0,5 \text{ ml / min}$ ).

3) Las fuentes de carbono a ensayar (10 mM) se preparan en la solución carrier del punto 2.

4) Se circula la fuente de carbono a ensayar durante 3 minutos a  $V = 2,5 \text{ ml / min}$ . La fuente de carbono llega a la celda de flujo a los 50 segundos (volumen muerto). Al minuto se comienza el registro de datos, y se le asigna  $t = 0$ .

5) Se detiene la bomba peristáltica ( $t = 3$  minutos). Si la acidificación progresa muy rápidamente, se detiene en  $t = 5$  minutos, y se circula carrier sin fuente de carbono. De otra manera se permite continuar la acidificación hasta  $t = 10$ .

6) Se circula carrier durante 10 minutos. Este tiempo de hambreado fue seleccionado para permitir que las células alcancen un status metabólico adecuado (baja concentración de fructosa di-fostato, alto  $\text{Pi}$  y  $\text{PEP}^9$ ), condición en que los carbohidratos son rápidamente transportados y fermentados ( $V = 4 \text{ ml / min}$  durante 2 minutos, luego  $V = 0,5 \text{ ml / min}$ ).

7) Se repite el paso 4 y subsiguientes tantas veces como fuentes de carbono sean ensayadas.

Los datos de acidificación pueden ser registrados en  $\Delta mV / \Delta t$  o en  $\Delta \text{pH} / \Delta t$ , ambas unidades interconvertibles conociendo la temperatura de trabajo y la sensibilidad del electrodo utilizado<sup>10</sup>. Dado que la mayor parte de la bibliografía relacionada con biosensores microbianos acoplados a electrodos potenciométricos<sup>11-12</sup> expresa sus datos en la primera de las unidades, se decidió utilizarlas también en este trabajo. En la primera parte de este capítulo, como otros autores<sup>8</sup>, se expresó la acidificación como  $\Delta \text{pH} / \Delta t$ .

En cuanto al análisis de los datos obtenidos, se observó que aún sin fuente de carbono adicionado al carrier, las células inmovilizadas producían una leve acidificación del medio. Se utilizaron estos valores como línea de base. Para normalizar los resultados, estos se expresaron en porcentaje, refiriendo a la glucosa el valor 100 % (pendiente de la curva de acidificación,  $\Delta mV / \Delta \text{min}$  o bien  $\Delta \text{pH} / \Delta \text{min}$ ).

Para comparar nuestro método con el método convencional se utilizaron los siguientes criterios: Se midió la pendiente entre 3 y 5 minutos ( $\Delta mV \text{ 3-5}$ ); valores de acidificación superiores al 8 % (respecto a glucosa) fueron considerados positivos

para la cepa en estudio; valores inferiores al 2 % fueron considerados negativos; para valores de entre 8 y 2% los verdaderos positivos se determinaron utilizando la pendiente entre los 8 y 10 minutos ( $\Delta mV$  8-10).

#### **8.4.5. Caracterización fisiológica**

Se caracterizó el comportamiento de esta cepa utilizando el sistema FIA, en las condiciones optimizadas que se describieron anteriormente. Puede observarse en la figura 8.8 que incluso cuando el flujo de carrier es elevado ( $V = 3 \text{ ml / min}$ ) la circulación de una fuente de carbono altamente fermentable modifica el pH de la celda de flujo ( $t$  entre 1 y 3 minutos).

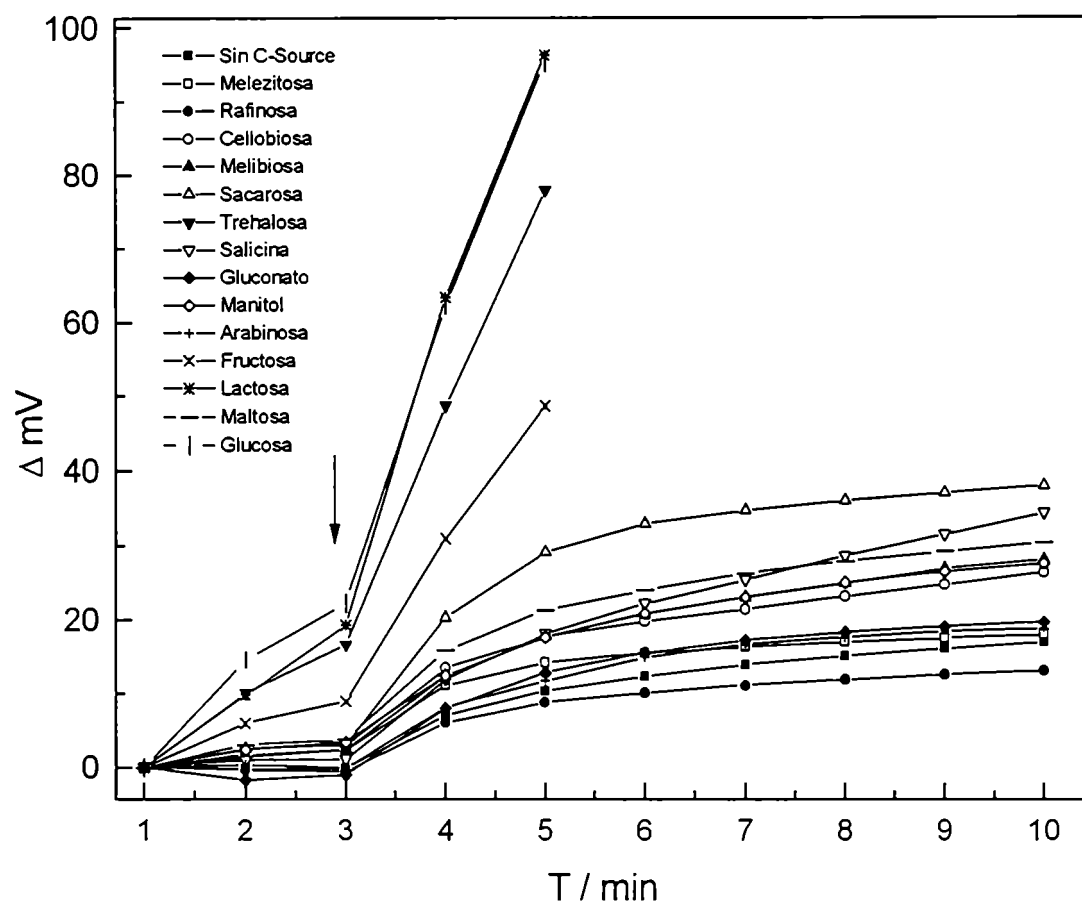


Figura 8.8. *Lactobacillus casei* ATCC393, precultivada en MRS-lactosa como fuente de carbono e inmovilizada en cuentas de alginato de calcio. La flecha indica el momento en que el flujo de carrier se interrumpe, permitiendo que la acidificación (mV) avance rápidamente. En la tabla 8.2 se resumen los resultados obtenidos.

<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393			
Carbohidrato (10 mmol / l)	Acidificación mV / min	% Relativo a glucosa	Técnica convencional
Melezitosa	0,64 ± 0,53	2,0 ± 1,6	d
Rafinosa	-0,62 ± 0,01	-2,0 ± 0,1	-
Celobiosa	2,04 ± 0,66	6,5 ± 1,9	+
Sacarosa	7,69 ± 1,31	24,6 ± 3,4	+
Trehalosa	25,35 ± 0,31	81,1 ± 3,3	+
Salicina	3,25 ± 0,26	10,4 ± 0,5	+
Gluconato	1,64 ± 0,11	5,2 ± 0,2	+
Manitol	1,80 ± 0,02	5,8 ± 0,1	+
Arabinosa	0,63 ± 0,23	2,0 ± 0,7	
Lactosa	33,25 ± 2,09	106,4 ± 3,4	+
Maltosa	3,47 ± 0,78	11,1 ± 2,1	+
Fructosa	14,53 ± 0,12	46,5 ± 1,0	+
Glucosa	31,26 ± 0,94	100,0 ± 3,0	+

Tabla 8.2. Determinación cuantitativa de la actividad fermentativa. El medio de crecimiento fue MRS-lactosa. Los datos se calcularon utilizando la pendiente de acidificación en el intervalo 3 - 5 min (ver figura 8.8), a los que se les restó la acidificación residual en ausencia de adición de fuente de carbono, considerada como línea de base (5,30 ± 1,11 mV). Las pendientes se obtuvieron mediante regresión lineal, ± su error standard. La técnica convencional se describe en la sección 3.5.3.

#### 8.4.6. Efecto del medio de precrecimiento

Los carbohidratos y otras posibles fuentes de carbono son transportados dentro de las células por mecanismos que involucran la acción de permeasas que utilizan como fuente de energía gradientes electroquímicos o energía química. Las permeasas ATP-dependientes y los sistemas PEP-PTS (sistema del fosfoenolpiruvato-fosfotransferasa) han sido detalladamente caracterizados en muchas especies de *Lactobacillus* <sup>13</sup>. El sistema PTS está involucrado en los

procesos de represión catabólica (CR), que en diferentes especies ocurre por diferentes caminos regulatorios; en la exclusión de inductores y la represión de la transcripción de los genes involucrados en el transporte y degradación de fuentes de carbono distintas a la glucosa esta involucrado el sistema PTS transportador de glucosa.

Se ensayaron distintas condiciones de cultivo, con el objetivo de evitar el fenómeno de CR. Como se observa en la tabla 8.3, las células cultivadas en glucosa no acidifican o acidifican débilmente la mayoría de las fuentes de carbono distintas a la glucosa, ocasionando falsos negativos. Este efecto de represión en los sistemas de transporte ocasionado por el sistema PTS-glucosa ha sido descrito por otros autores<sup>14-15</sup>.

Condición de Cultivo <sup>a</sup>	Lactosa	Maltosa	Glucosa	Melezitosa
Melezitosa	2,0	9,1	1,3	97,6
Rafinosa	-2,0	3,4	1,2	7,5
Sacarosa	24,6	19,8	2,4	11,6
Trehalosa	81,1	82,5	52,0	nd
Salicina	10,4	3,8	-4,7	-4,2
Manitol	5,8	-3,8	3,2	7,0
Arabinosa	2,0	3,2	2,3	nd
Lactosa	106,4	3,4	6,2	nd
Maltosa	11,1	54,4	0,1	nd
Fructosa	46,5	62,8	52,2	nd
Glucosa	100,0	100,0	100,0	100,0

Tabla 8.3. Efecto del medio de precrecimiento en la respuesta metabólica (capacidad fermentativa) de *Lactobacillus* inmovilizado en gel de alginato. <sup>a</sup> El medio de crecimiento fue MRS basal con el agregado de la fuente de carbono indicada, en una concentración final de 2 % p / v. nd: no determinado.

## **8.5. Aplicación a la caracterización del aislamiento Y3 y la cepa tipo**

### ***Lactobacillus plantarum* ATCC14917**

#### **8.5.1. Caracterización Metabólica de la cepa Y3**

En la intención de generar un biosensor aplicable a la industria lechera, se caracterizó un aislamiento de yogur comercial como cepa incógnita.

Se inmovilizaron células provenientes de un cultivo en medio MRS basal, 2 % p / v en lactosa, durante 24 hs. Se prepararon distintas fuentes de carbono para evaluar si eran fermentados por esta cepa, en una concentración 0,2 % p / v en medio MRS basal adicionado con calcio (0,5 g / l  $\text{CaCl}_2$ ). Como carrier se empleó MRS basal adicionado con calcio. Como puede observarse en la tabla 8.4, existe buena correspondencia entre los resultados obtenidos utilizando este método y el método clásico (sección 3.5.3.), aunque utilizando cellobiosa los resultados no coinciden con aquellos proporcionados por los métodos clásicos.



Cepa Y3			
Carbohidrato (10 mmol / l)	Acidificación *	% Relativo a glucosa	Técnica convencional
Melezitosa	6,77	17,41	+
Rafinosa	0,58	1,49	-
Celobiosa	-0,97	-2,49	d
Trehalosa	31,9	82,09	+
Sacarosa	20,49	52,74	+
Salicina	11,21	28,86	+
Gluconato	3,29	8,46	+
Xilosa	-0,58	-1,49	-
Manitol <sup>a</sup>	0,94	2,42	+
Lactosa	37,31	96,02	+
Fructosa	30,74	79,10	+
Glucosa	38,86	100,00	+

Tabla 8.4. Comparación del método clásico para la caracterización metabólica y los resultados obtenidos en este trabajo. Se restó en todas las fuentes de carbono el valor de  $\Delta mV$  correspondiente al carrier (2,10 mV), considerado como la línea de base. \* Variación de pH (mV) en el intervalo 3 - 5 minutos. <sup>a</sup> Utilizando el intervalo de fermentación 8 - 10 minutos la respuesta es positiva.

#### 8.5.2. Resultados obtenidos con *Lactobacillus plantarum* ATCC14917

Se caracterizó esta cepa utilizando el procedimiento habitual. Los datos obtenidos son consistentes con la caracterización microbiológica clásica.

<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC14917		
Carbohidrato (10 mmol l <sup>-1</sup> )	% Relativo a glucosa	Técnica convencional
Melezitosa	13,1	+
Rafinosa	24,1	+
Celobiosa	48,6	+
Sacarosa	30,7	+
Trehalosa	69,3	+
Salicina	58,3	+
Gluconato	12,5	+
Manitol	43,0	+
Arabinosa	42,8	+
Lactosa	99,2	+
Maltosa	8,6	+
Fructosa	86,2	+
Glucosa	100,0	+

Tabla 8.5. Resultados obtenidos en la caracterización metabólica para *Lb. plantarum*. La pendiente (mV / min) para glucosa fue de 24,8.

#### 8.6. Relación entre la acidificación y la producción de ácido L-láctico.

Se utilizó el biosensor enzimático bicapa (LOx-HRP) diseñado (Capítulo 7.4.) para seguir el curso de una fermentación láctica en leche. Los resultados obtenidos indican que el cambio de acidez (mV) es proporcional al cambio en la concentración de L-lactato en el medio de leche. Las diferencias entre estas dos variables, que se observan en la figura 8.9 posiblemente se deban a que el cambio de acidez depende del aumento en la concentración de ácido láctico y de la resistencia (capacidad buffer) del medio a los cambios de pH. La leche posee varios sistemas buffer, los fosfatos y carbonatos son importantes.

Una segunda posibilidad es que la proporción L / D lactato cambie en el transcurso de la fermentación.

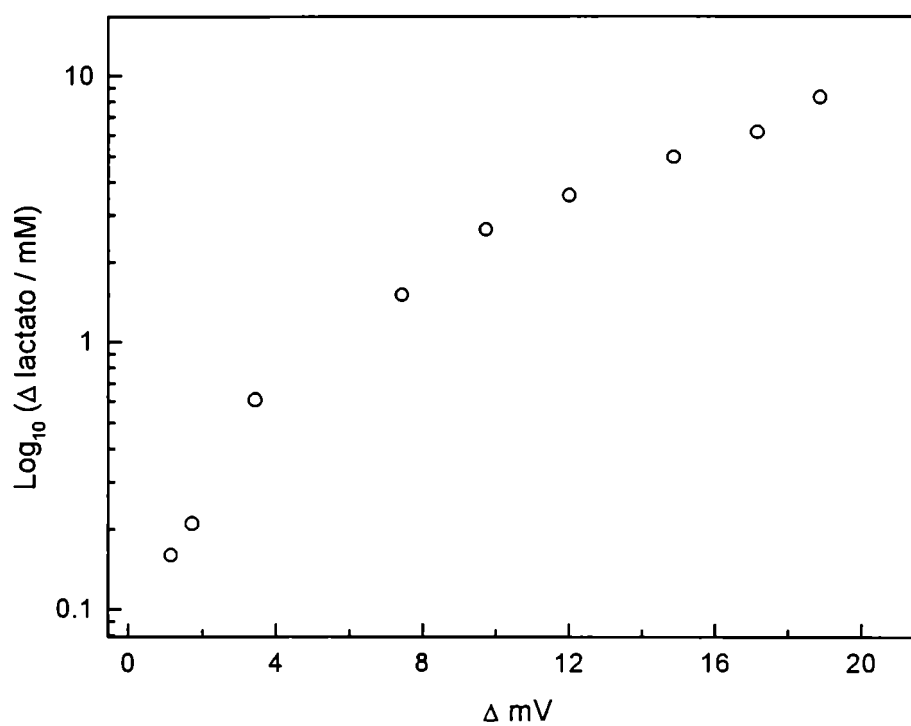


Figura 8.9. Producción de ácido L-láctico durante la fermentación realizada por cultivos comerciales y su relación con el cambio de pH (mV). Inoculo 1:100 en leche descremada reconstituida.

## 8.7. Referencias

1. Kandler O.; Weiss N.; Regular, Nonsporing Gram-Positive Rods. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol 2*. Holt J.G. Editor, section 13. Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1986.
2. De Man J.C.; Rogosa M.; Sharpe M.E.; *J. Appl. Bacteriol.* **23** (1960) 130.
3. Matsunaga T.; Karube I.; Suzuki S.; *Analytica Chimica Acta* **99** (1978) 233.
4. Oyaas J.; Storro L.; Levine D.W.; *App. Microbiol. Biotechnol.* **46** (1996) 240.
5. Speirs D.E.; Halling P.J.; McBeil B.; *App. Microbiol. Biotechnol.* **43** (1995) 440.
6. Riedel K.; Lehmann M.; Adler K.; Kunze G.; *Antonie van Leewenhoek* **62** (1997) 345.
7. Riedel K.; Kunze G.; *Microbiol. Res.* **14** (1997) 233.
8. Je-Kyun P.; Min-Chol S.; Seung-Goo L.; Hak-Sung K. *Biotech. Prog.* **11** (1995) 58.
9. Thompson J.; *Sugar transport in lactic acid bacteria* en Sugar transport and Metabolism in Gram-positive bacteria. J. Reizer y A Peterkofsky Editores. Ellis Horwood Limited Publishers, Chichester, 1990.
10. Determination of pH, Theory and Practice. Bates R.G., Wiley, N.Y., 1973.
11. Matsunaga T.; Karube I.; Suzuki S.; *Analytica Chimica Acta* **99** (1978) 233.
12. Hikuma M.; Obana H.; Yasuda T.; Karube I.; Suzuki S.; *Analytica Chimica Acta* **116** (1980) 61.
13. Saier M.H. Jr.; Chauvaux S.; Cook G.M.; Deutscher J.; Paulsen I.T.; Reizer J.; Ye J.J.; *Microbiology* **142** (1996) 217.
14. Saier M.H. Jr.; *Res Microbiol* **147** (1996) 439.
15. Saier M.H. Jr.; Crasnier M.; *Res Microbiol* **147** (1996) 482.

## 9. DISCUSION

Se construyeron biosensores enzimáticos cableados basados en la inmovilización de GOx en un hidrogel redox formado por el entrecruzamiento de la enzima, PAAOs y PEG como entrecruzante, sobre electrodos de carbón vítreo y de oro. Se estudió el rango de linealidad y la reproducibilidad de estos electrodos al ser utilizados como detectores en un sistema FIA, en una celda de tipo wall-jet. El rango de linealidad (1,25 - 10 / 20 mM) son similares a los informados <sup>1</sup>. Estos electrodos (Capítulo 4.2.) poseen una carga enzimática de 21  $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ ; otros autores <sup>2</sup>, utilizando elevadas cargas enzimáticas sobre los electrodos (71  $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ ) han observado una disminución del rango lineal (glucosa 5 mM).

De todas maneras, el rango lineal es dependiente también de otros factores distintos a la concentración de enzima, como la velocidad de difusión de sustrato y producto dentro de la matriz del hidrogel, las condiciones del ensayo (sistemas hidrodinámicos, como las celdas de flujo y electrodos rotatorios, o sistemas en donde no está favorecido el transporte de masa) y la presencia de membranas protectoras que actúan como barreras difusivas.

Se estudió el efecto de distintas proporciones de entrecruzante; para ello se construyeron electrodos donde la concentración de PEG es la variable. Se observó (figura 4.6.) que las corrientes catalíticas disminuyen al aumentar la concentración de PEG, debido fundamentalmente al efecto aislante del PEG entre los centros redox del polímero electroactivo y el grupo prostético (FAD) de las enzimas. En cuanto a la estabilidad al ser ensayados estos electrodos en el sistema de flujo, en la figura 4.9 se observa que el PEG aumenta la estabilidad de los electrodos; es interesante el hecho de que aún sin entrecruzante las interacciones electrostáticas entre la enzima y la PAAOs son suficientes para obtener una membrana cuya estabilidad en el sistema FIA es menor. La propagación de carga sobre los electrodos es máxima cuando la relación PEG / PAAOs es cercana a 0,3.

Mediante voltametrías cíclicas se estudió el efecto del cambio de fuerza iónica en el medio. Dos importantes efectos se han observado; en ausencia de sustrato se observa un cambio en el potencial pico del polímero, a medida que aumenta la fuerza iónica del medio se observa un corrimiento del mismo a valores mas catódicos (figura 4.12.); la concentración de sal afecta la estabilidad de los estados de oxidación, siendo el Os(II) más fácil de oxidar a mayor fuerza iónica, probablemente una alta concentración estabilice el estado de oxidación más alto. El valor de corriente ( $i_{pa}$ ) y

la carga sobre el electrodo prácticamente no cambian, por lo cual puede inferirse que la sal no tiene efecto en el mecanismo de propagación de la carga.

En presencia de glucosa (10 mM) las corrientes catalíticas difieren al variar la fuerza iónica del medio, como se observa en la figura 4.13.; al aumentar la fuerza iónica la corriente catalítica disminuye sensiblemente. Esta disminución sugiere una fuerte interacción electrostática entre el polímero cargado positivamente, que contiene al polímero de osmio, y la enzima, que al pH de los ensayos se encuentra cargada negativamente. La concentración elevada de sal produce un apantallamiento de esta interacción. También sugiere que el uso de PEG no produce un entrecruzamiento rígido del gel.

Se estudió el efecto del cambio de pH y temperatura en los electrodos, en líneas generales muestran que la enzima inmovilizada posee un pH óptimo más ácido y es más estable a temperaturas altas que la enzima libre, en solución.

Biosensores enzimáticos cableados basados en LOx se estudiaron mediante técnicas de voltametría cíclica y de cronoamperometría. Se estudió el efecto de la carga de enzima en el electrodo respecto a la magnitud de las corrientes catalíticas y la estabilidad en el tiempo; encontrándose que a mayor carga enzimática mayor estabilidad temporal (tabla 5.1.). El valor óptimo de pH para este sistema (figura 5.7.) es algo más alcalino que para la enzima en solución, posiblemente debido a el microambiente dentro del gel, que sumado a la polarización del electrodo suele provocar diferencias de pH entre la matriz del gel y la solución en la que se encuentra. La inmovilización en el gel redox no provocó efecto de estabilización respecto a la temperatura (figura 5.8.), fenómeno observado cuando se inmoviliza la enzima en sistemas más rígidos que el nuestro<sup>3</sup>.

La sensibilidad del biosensor (14,3  $\mu\text{A}$  / L-lactato, mM) es muy buena, superior a la mayoría de los trabajos publicados. Esto posiblemente sea debido a que la estructura abierta del gel redox no impone barreras difusivas importantes para el sustrato y el producto; posiblemente sea importante también que en nuestro sistema el cofactor fisiológico ( $\text{O}_2$ ) no es necesario. Se estudió el efecto de la variación de la fuerza iónica en el medio; en contraste con los electrodos GOx, la exposición a soluciones con alto contenido de sal ( $\text{KNO}_3$ , 500 mM) provoca una pérdida irreversible y total de la corriente catalítica; posiblemente este efecto esté relacionado con características intrínsecas de la enzima, ya que se comprobó que el polímero redox mantenía su estabilidad.

Los experimentos descritos en el capítulo 6 demuestran que los componentes de alto peso molecular, como las caseínas, inactivan al sensor. Los

experimentos realizados con mediador soluble en leche demuestran que la enzima no es inhibida, al menos completamente, por la leche. La interacción entre el polímero de osmio y la enzima se ve afectada por la presencia de caseína que a pH 7,0 se encuentran cargadas negativamente <sup>4 - 5</sup>. La glucosa oxidasa también tiene una elevada carga negativa <sup>6</sup> y las interacciones electrostáticas con el polímero redox son importantes en la transferencia de electrones <sup>7</sup>. Es factible que algunas de las fracciones de las caseínas difundan en el gel redox formado por las enzimas y la PAAOs impidiendo la transferencia de electrones hasta la superficie del electrodo de trabajo.

Los intentos realizados para proteger los biosensores monoenzimáticos en medio de leche resultaron infructuosos. El sistema es muy inestable en leche, por lo que sería apropiado su uso en diluciones importantes de esta. Otros autores han medido productos lácteos fermentados (de elevada concentración de L-lactato) con éxito empleando diluciones 1:500 o aún mayores <sup>8</sup>.

En ausencia de sustrato, a potenciales de + 400 mV vs ECS y superiores se registran corrientes algo menores a 1  $\mu$ A en leche; la presencia de sustancias oxidables está bien estudiada en sangre y hemoderivados, siendo las principales interferencias el ascorbato y el ureato <sup>9</sup>, entre otros. En leche las sustancias electroactivas han sido poco estudiadas, aunque algunos autores han utilizado sistemas con dos electrodos de trabajo, uno de ellos utilizados como blanco, con el objetivo de descontar la corriente producida por interferencias electrooxidables <sup>10</sup>, utilizando diluciones entre 1:20 y 1:200 de productos lácteos fermentados.

Se ensayó la construcción de biosensores enzimáticos monocapa basados en peroxidasa sobre electrodos de oro o carbón vítreo, mostrando estos últimos adecuadas características para ser empleados junto con esta oxidasa. Se estudió sus características en sistemas batch y FIA

Se diseñaron distintos tipos de biosensores bienzimáticos bicapa; el procedimiento para inmovilizar la capa de lactato oxidasa utilizando BSA (tabla 7.3) resultó inadecuado, a pesar de que otros autores <sup>11</sup> han utilizado similares relaciones BSA : glutaraldeído : proteína (LOx). Esto puede ser explicado dado que en dicho trabajo han utilizado lactato oxidasa con una actividad específica (UE / mg proteína) aproximadamente 10 veces mayor que la utilizada por nosotros (312 UE / mg vs 34 UE / mg); posiblemente aunque el procedimiento de inmovilización sea muy agresivo para la enzima, la actividad remanente es suficiente para la operación del biosensor.

El problema de la baja actividad específica de la enzima utilizada no puede ser superado incluyendo en el sensor una masa mucho mayor de proteína, ya que es de esperar que su efecto como barrera difusiva sea mayor.

Si comparamos la cantidad de LOx en sistemas bicapa basados en estas mismas enzimas<sup>11</sup>, hemos utilizado (bienzimático 4, tabla 3.2) una cantidad unas 15 veces menor ( $28,6 \text{ UE} / \text{cm}^2$  vs  $438,5 \text{ UE} / \text{cm}^2$ ), obteniéndose corrientes catalíticas a saturación de sustrato similares (aprox.  $100 \mu\text{A} / \text{cm}^2$ ) por lo que se concluye que tanto el sistema de inmovilización (PAA / PEG) como las características del mediador redox utilizado (PAAOs) son muy adecuados para la construcción de biosensores enzimáticos cableados. En electrodos bienzimáticos (bienzimático 3, tabla 3.2) con menor cantidad de LOx las corrientes máximas han sido menores, de  $21 \mu\text{A} / \text{cm}^2$ ; en estos hemos utilizado solo  $4,7 \text{ UE} / \text{cm}^2$  de lactato oxidasa.

Se estudió el efecto de la leche sobre ambas capas enzimáticas, demostrándose que la capa de peroxidasa cableada no se ve afectada, y que la lactato oxidasa es inhibida por algún componente de la leche. Esta inhibición resulta en parte reversible, y ha sido observada por otros autores<sup>10</sup> utilizando LOx en medio de leche, en diluciones entre 1:160 y 1:16, aunque su naturaleza se desconoce.

Para lactato oxidasa proveniente de otras fuentes (*Mycobacterium smegmatis*) ha sido reportado como inhibitorio el oxalato<sup>12</sup>, con reacción irreversible en presencia de luz; la concentración de oxalato en leche es de entre 3 - 7 mg / l. Para lactato oxidasa proveniente de *Mycobacterium phlei* son inhibidores el piruvato, producto de la oxidación del lactato, y el glicidato<sup>13</sup>.

Un exceso de enzima (LOx) dispuesta en dos capas sucesivas aumenta la estabilidad del electrodo bienzimático. Posiblemente los inhibidores sean retenidos o "filtrados" selectivamente por la capa externa de LOx, permitiendo que el exceso de enzima oxide al L-lactato.

Se midieron muestras lácteas, productos fermentados, y se siguió la evolución en la concentración de L-lactato en fermentaciones lácticas. Los resultados obtenidos son similares a los informados por otros autores<sup>12</sup>.

La leche es una matriz sumamente compleja, es mandatorio el procesado (clean-up) en los métodos químico-analíticos convencionales; en nuestro sistema el único proceso previo al análisis es la dilución, y el resultado analítico puede obtenerse en menos de 30 segundos. Se validó el sistema utilizando la técnica de adición de standard, método reconocido que permite considerar el efecto de la matriz analítica.



En las muestras de leche sin diluir o a muy baja dilución el efecto de la matriz es importante; sin tratamiento previo se registran valores del 40 % respecto a los valores obtenidos utilizando pretratamientos sencillos, como la quelación con EDTA (concentración final 2 %) que corresponden con los valores obtenidos utilizando un método espectrofotométrico enzimático convencional para la determinación de L-lactato (aún sin pretratamiento los valores pueden ser correlacionados con los valores reales de las muestras, por lo que analíticamente en método sería válido).

Se ha descrito un método rápido para determinar la capacidad fermentativa de LAB especies. Este método permite cuantificar esta capacidad, proporcionando una información más completa del metabolismo de los hidratos de carbono; posibilita el estudio de cepas mutantes suministrando información más completa acerca de las posibles modificaciones en el metabolismo de los fuentes de carbono utilizadas.

La reducción en el tiempo de los ensayos de caracterización es importante, debido a que una vez preparada la columna no es necesaria una incubación posterior. Las mediciones involucran aproximadamente 15 minutos para cada hidrato de carbono, y pueden ser cuantificados secuencialmente, en contraste con los tiempos de incubación (18 hs - 3 días) requeridos para obtener resultados utilizando las técnicas convencionales.

Las condiciones necesarias (precrecimiento y cosecha de células, inmovilización en alginato de calcio y la preparación de la columna) requieren menos tiempo que la técnica convencional basada en el cambio de color de un indicador de pH. La técnica descrita aquí permite inclusive el almacenado de las células inmovilizadas hasta 20 días para su posterior uso.

La biomasa necesaria para obtener respuestas en los breves tiempos de medición utilizados (máximo 10 minutos) es un factor importante; D.O. (550 nm) menores o iguales a 2 producen respuestas menores (60 %) que las observadas con cultivos con D.O. = 3. Inclusive hemos registrado falsos negativos para cellobiosa, sacarosa, salicina y gluconato. Esto representa un inconveniente para el estudio de cepas de crecimiento lento, con incubaciones mayores a 24 hs. para obtener la masa celular necesaria. De todos modos, aun cuando las pendientes (mV / min) son menores se puede utilizar estas células inmovilizadas, ya que se considera a los fines de la caracterización los valores porcentuales de acidificación respecto a la glucosa.

La condición de precrecimiento es muy importante, la represión catabólica es la principal dificultad a ser superada. El crecimiento en fuentes de carbono que no producen CR (lactosa) permitió evitar este fenómeno. Falsos negativos obtenidos con melezitosa (*Lb. casei*) fueron revertidos al cultivar la cepa en esa fuente de carbono. De todos modos, otros falsos negativos se observaron al utilizar esta fuente de carbono en el medio

de cultivo. El precrecimiento en lactosa se seleccionó, ya que en esta condición son mínimos los falsos negativos.

La reproducibilidad de la técnica descrita, cuando el medio de precrecimiento es lactosa y en las condiciones optimizadas que se describieron (Capítulo 8.4.) es del orden del 5 % entre distintos experimentos. La utilización de maltosa como medio de precrecimiento también es adecuado; sin embargo, los valores de fermentabilidad para algunos azúcares son algo diferentes.

Las técnicas convencionales han permitido obtener información cualitativa acerca del metabolismo de los carbohidratos <sup>14</sup>; el método descrito en esta Tesis permite cuantificar el patrón de fermentación de microorganismos mutantes, lo que es un dato clave a ser evaluado. Los estudios realizados utilizando carbohidratos marcados radiactivamente permiten determinar las velocidades de transporte y sus mecanismos, no obteniéndose información acerca del catabolismo del azúcar transportado <sup>15-16</sup>.

La acidificación, en nuestro caso, permite recabar información cuantitativa acerca del transporte y el catabolismo de los hidratos de carbono. La información obtenida es adecuada para la evaluación del comportamiento de cepas mutantes o bien para la selección de materias primas adecuadas para diseño de medios de cultivo mejores o más baratos para el crecimiento de cepas industriales.

## 9.1. Referencias

1. Gregg B.A.; Heller A.; *Anal. Chem.* **62** (1990) 258.
2. Ohara T.J.; Vreeke M.S.; Battaglini F.; Heller A.; *Electroanalysis* **5** (1993) 825.
3. Hajizadeh K.; Halsall B.; Heineman W.; *Talanta* **38** (1991) 37.
4. Fundamentals of Dairy Chemistry. Wong N.P. Editor. Van Nostrand Reinhold, New York, 1988.
5. Science du Lait. Alais C. Editor, Reverte, Barcelona, 1985.
6. Frederick K.; Tung J.; Emerick R.S.; Masiarz F.R.; Chamberlain S.H.; Vasavada A.; Rosenberg S.; Chakraborty S.; Schopfer L.M.; Massey V.; *J. Biol. Chem.* **229** (1993) 153.
7. Calvo E.J.; Etchenique R.; Danilowicz C.; Diaz L.; *Anal. Chem.* **68** (1996) 4186.
8. Hajizadeh K.; Halsall H.B.; Heineman W.R.; *Talanta* **38** (1991) 37.
9. Biosensors. Cass, A.E.G. Editor. Oxford University Press, Oxford, 1990.
10. Collier W.A.; Janssen D.; Hart A.L.; *Biosensors and Bioelectronics* **11** (1996) 1041.
11. Ohara T.J.; Vreeke M.S.; Battaglini F.; Heller A.; *Electroanalysis* **5** (1993) 825.
12. Ghisla S.; Massey V.; *J. Biol. Chem.* **250** (1975) 577.
13. Sutton W.B.; *J. Biol. Chem.* **226** (1957) 395.
14. Veyrat A.; Monedero V.; Perez-Martinez G.; *Microbiology* **140** (1994) 1141.
15. Romano A.H.; Brino G.; Peterkofsky A.; Reizer J.; *J. Bacteriol.* **169** (1987) 5589.
16. Ye J.J.; Neal J.W.; Cui X.; Reizer J.; Saier M.H. Jr.; *J Bacteriol* **176** (1994) 3484.

## 10. CONCLUSIONES

El polímero electroactivo utilizado (PAAOs) presenta una muy buena señal catalítica, ya sea para la detección de L-lactato, glucosa o peróxido de hidrogeno.

El PEG aumenta la estabilidad de los electrodos basados en GOx, cantidades elevadas de este entrecruzante disminuyen las corrientes catalíticas.

El efecto de medios de distinta fuerza iónica, pH o temperatura es importante al utilizar los biosensores diseñados como detectores en sistemas de inyección en flujo o bien en batch.

La leche afecta el funcionamiento de los electrodos monoenzimáticos basados en LOx o GOx; electrodos bienzimáticos (HRP / LOx) con alta carga de LOx pueden operar en esa compleja matriz analítica.

La técnica de inmovilización en alginato de calcio es adecuada para el diseño de biosensores microbianos; es de especial importancia considerar los efectos de transporte de masa en el gel.

Es posible utilizando sensores potenciométricos de pH y *Lactobacillus* inmovilizados cuantificar la capacidad metabólica de estos para degradar distintos sustratos, en sistemas de flujo de tipo stop-flow.